#### (19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報(A)

# (II)特許出願公表番号 特表平11-503616

(43)公表日 平成11年(1999) 3月30日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>		識別記号	F I	FI						
C 1 2 N	15/09	ZNA		C 1	2 N	15/00		ZNAA		
A 0 1 K	67/027			A 0	1 K	67/027				
A 6 1 K	35/74			A 6	1 K	35/74		D		
	38/00	ADΤ				48/00		ABJ		
	48/00	ABJ		C 0	7 K	14/715				
			審查請求	未請求	予備	審查請求	有	(全294頁)	最終頁に続く	
(21)出願番号	<del></del>	特願平9-523861		(71)	出願	<b>し アムジ</b>	エン・	インコーポレ	ーテツド	
(86) (22)出願日		平成8年(1996)12月20日	1996)12月20日			アメリカ合衆国、カリフオルニア・91320				
(85)翻訳文提出日		平成9年(1997)8月15日			-1789	、サウ	ザンド・オー	クス、デハビル		
(86)国際出願番号		PCT/US96/20			ランド	ランド・ドライブ・1840、アムジエン・セ				
(87)国際公開番号		WO97/23614			ンター					
(87)国際公開日		平成9年(1997)7月3日		(72)	(72)発明者 ポイル,ウイリアム・ジエイ				1	
(31)優先権主張番号		08/577, 788		アメリカ合衆国、カリフオルニア、ムー				ルニア、ムーア		
(32)優先日		1995年12月22日				パーク	、チエ	ストナツト・	リツジ・ストリ	
(33)優先権主張国		米国 (US)				~h•	11678			
(31)優先権主張番号		08/706, 945		(72)	発明者 レイシー,デイビツト・エル					
(32)優先日		1996年9月3日			アメリカ合衆国、カリフオルニア、サウ				ルニア、サウザ	
(33)優先権主張国		米国 (US)				ンド・	オーク	ス、パセオ・	ビスタ・614	
				(74)	代理人	人 弁理士	川口	義雄(外	2名)	
									最終頁に続く	
				1						

## (54) 【発明の名称】 オステオプロテゲリン

#### (57)【要約】

本発明は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンパーであって、骨代謝の調節に関与するオステオプロテゲリンと呼ばれる分泌ポリペプチドを開示する。また、オステオプロテゲリンをコードする核酸、ポリペプチド、組換えベクターおよび発現のための宿主細胞、〇PGに結合する抗体、および医薬組成物を開示する。該ポリペプチドは骨粗鬆症のごとき増大された再吸収によって特徴付けられる骨疾患を治療するのに使用される。

## 【特許請求の範囲】

- 1. OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを含むポリペプチドをコード する単離された核酸であって、該核酸が:
- (a) 図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122) 、および9C-9D(配列番号:124)で示される核酸またはその相補的鎖;
- (b) 図 2B-2C (配列番号: 120)、9A-9B (配列番号: 122)、および 9C-9D (配列番号: 124) で示されるペプチドーコーディング領域とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸:
- (c)包括的に図1Aに示されたヌクレオチド148ないし337とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸;および
- (d)(a)、(b)および(c)の核酸に対して縮重した核酸; よりなる群から選択される該単離された核酸。
- 2. c D N A、ゲノミック D N A、合成 D N A または R N A である請求項 1 記載の核酸。
  - 3. 請求項1記載の核酸によってコードされたポリペプチド。
- 4. エシェリキア・コリ (<u>Escherichia</u> <u>coli</u>) 発現に好ましい 1以上のコドンを含む請求項 1 記載の核酸。
  - 5. それに結合した検出可能な標識を有する請求項1記載の核酸。
- 6. 図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、 および9C-9D(配列番号:124)のポリペプチドーコーディング領域を含む請求項1記載の核酸。
- 7. ヌクレオチド158-1297からの図9C-D(配列番号:124)で 示された配列を有する請求項6記載の核酸。
  - 8. 請求項1記載の核酸を含む発現ベクター。
- 9. 該核酸が図9C-9D(配列番号:124)で示されたポリペプチドーコーディング領域を含む請求項8記載の発現ベクター。
- 10. 請求項8記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた 宿主細胞。

- 11. 真核生物細胞である請求項10記載の宿主細胞。
- 1 2. CHO、COS、293、3T3、CV-1およびBHK細胞よりなる 群から選択される請求項11記載の宿主細胞。
  - 13. 原核生物細胞である請求項10記載の宿主細胞。
- 14. エシェリキア・コリ(<u>Escherichia</u> <u>coli</u>)である請求項13記載の宿主細胞。
  - 15. 請求項8記載の発現ベクターを含むトランスジェニック哺乳動物。
  - 16. 齧歯類である請求項15記載のトランスジェニック哺乳動物。
  - 17. マウスである請求項16記載のトランスジェニック哺乳動物。
- 18. 適当な栄養条件下で、請求項1記載の核酸で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を増殖させ;次いで、

該核酸の発現のポリペプチド産物を単離することを特徴とするOPGの生産方法。

- 19. OPGを含む精製され単離されたポリペプチド。
- 20. 哺乳動物 O P G である 請求項 19 記載のポリペプチド。
- 21. ヒトOPGである請求項20記載のポリペプチド。
- 22. 実質的に他のヒト蛋白質を含まない請求項19記載のポリペプチド。
- 23. 図2B-2C(配列番号:121)、9A-9B(配

列番号:123)、および9C-9D(配列番号:125)で示されるアミノ酸配列を有する請求項21記載のポリペプチドまたはその誘導体。

- 24.包括的に残基22-401からの図9C-9D(配列番号:125)で 示されるアミノ酸配列を有する請求項23記載のポリペプチド。
- 25. 包括的に残基32-401からの図9C-9D(配列番号:125)で 示されるアミノ酸配列を有する請求項23記載のポリペプチド。
- 26. 外因性DNA配列の発現の産物であることによって特徴付けられる請求 項19記載のポリペプチド。
  - 27. 該DNAがcDNA、ゲノミックDNAまたは合成DNAである請求項

- 26記載のポリペプチド。
  - 28. 水溶性ポリマーで修飾されている請求項19記載のポリペプチド。
- 29. 該水溶性ポリマーがポリエチレングリコールである請求項28記載のポリペプチド。
- 3 0. 腫瘍壊死因子受容体細胞外領域のシステインリッチドメインに特徴的な 4 つのシステインーリッチドメインを含む少

なくとも約164アミノ酸のアミノ酸配列;および増大した骨密度の活性を含むポリペプチド。

- 31. 残基 22のアミノ末端を有する図 2B-2C(配列番号:121)、9A-9B(配列番号:123)または 9C-9D(配列番号:125)で示されるアミノ酸配列を含み、1ないし 216 アミノ酸がカルボキシル末端から欠失されているポリペプチド。
- 3 2. 包括的に残基 2 2 1 8 5 、 2 2 1 8 9 、 2 2 1 9 4 、または 2 2 2 0 1 からのアミノ酸配列を含む請求項 3 1 記載のポリペプチド。
- 33. さらにカルボキシル末端から伸びるヒトIgG1のFc領域を含む請求項32記載のポリペプチド。
- 34. 残基 220 アミノ末端を有する図 2B-2C(配列番号:121)、9A-9B(配列番号:123)または 9C-9D(配列番号:125)で示されるアミノ酸配列を含み、1 ないし10 アミノ酸がアミノ末端から欠失されており、所望により 1 ないし 216 アミノ酸がカルボキシル末端から欠失されていてもよいポリペプチド。
  - 35. 包括的に残基27-185、27-189、27-1

94、27-401、または32-401からのアミノ酸配列を含む請求項34 記載のポリペプチド。

36. さらに、カルボキシル末端から伸びるヒトIgG1のFc領域を含む請求項35記載のポリペプチド。

37.

```
huOPG[22-201]-Fc,
 huOPG[22-401]-Fc,
 huOPG [22-180] -Fc,
 huOPG met [22-401]-Fc,
 huOPG Fc-met [22-401],
 huOPG met [22-185],
 huOPG met [22-189],
 huOPG met [22-194],
 huOPG met [27-185],
 huOPG met [27-189],
 huOPG met [27-194],
 huOPG met [32-401],
 huOPG met-lys [22-401],
 huOPG met [22-401],
 huOPG met [22-401] -Fc (P25A),
 huOPG met [22-401] (P25A),
 huOPG met [22-401] (P26A),
 huOPG met [22-401] (P26D),
 huOPG met [22-194] (P25A),
 huOPG met [22-194] (P26A),
 huOPG met met - (lys)_3 [22-401],
 huOPG met met-arg-gly-ser-(his) 6 [22
-401
```

- よりなる群から選択されるポリペプチド。
  - 38. 請求項37記載のポリペプチドをコードする核酸。
  - 39. OPGに特異的に結合する抗体またはその断片。
  - 40. モノクローナル抗体である請求項39記載の抗体。
  - 41. OPGへの抗体の結合を可能とする条件下で請求項39記載の抗体と共

に試料をインキュベートし:次いで、

結合した抗体を検出することを特徴とする生物学的試料中のOPGの存在を検出する方法。

42. 結合を可能とする条件下で候補物質と共にOPGをインキュベートし; 次いで、

結合物質を測定することを特徴とするOPGに結合する候補物質の能力を評価する方法。

- 43. OPGをコードする核酸で動物を修飾することを特徴とする動物においてOPGのレベルを調節する方法。
- 4 4. 該核酸が OPGの組織レベルにおける増加を促進する請求項 4 3 記載の 方法。
  - 45. 該動物がヒトである請求項44記載の方法。
- 4 6. 医薬上許容される担体、アジュバント、可溶化剤、安定化剤および/または抗酸化剤中の治療上有効量のOPGを含む医薬組成物。
  - 47. 該OPGがヒトOPGである請求項46記載の組成物。
- 48. 該OPGが図9Bで示されるアミノ酸配列を有する請求項47記載の組成物。
- 49.治療上有効量の請求項19記載のポリペプチドを投与することを特徴とする骨障害を治療する方法。
  - 50. 該ポリペプチドがヒトOPGである請求項49記載の方法。
  - 51. 該骨障害が過剰な骨喪失である請求項49記載の方法。
  - 5 2. 該骨障害が骨粗鬆症、骨のパジェット病、高カルシウ

ム血症、副甲状腺機能亢進症、ステロイド-誘発骨減少症、慢性関節リウマチによる骨喪失、骨髄炎による骨喪失、骨溶解転移、および歯周骨喪失よりなる群から選択される請求項51記載の方法。

5.3. さらに、骨形態発生蛋白質 BMP -1 ないし BMP -1.2、 TGF  $-\beta$  ファミリーのメンバー、 IL -1 阻害剤、 TNF  $\alpha$  阻害剤、副甲状腺ホルモンお

よびそのアナログ、副甲状腺ホルモン関連蛋白質およびそのアナログ、Eシリーズのプロスタグランジン、ビスホスホネート、および骨増強性ミネラルよりなる群から選択される物質の治療上有効量を投与することを特徴とする請求項49記載の方法。

- 54. 複数のオステオプロテゲリンモノマーよりなるオステオプロテゲリン多量体。
  - 55. ダイマーである請求項54記載の多量体。
  - 56. 鎖内ジスルフィド結合によって形成された請求項54記載の多量体。
- 57. ヒトIgG1に由来するのFc領域との組合せによって形成された請求項54記載の多量体。
  - 58. オステオプロテゲリンモノマーおよび不活性な多量体

を実質的に含まない請求項54記載の多量体。

- 59.該モノマーが残基22-401からの図9C-9D[配列番号:125
- ] で示されるアミノ酸配列を含む請求項54記載の多量体、またはその誘導体。
  - 60. 該モノマーが残基 22-194からの図9C-9D [配列番号:125
- ] で示されるアミノ酸配列を含む請求項54記載の多量体。

#### 【発明の詳細な説明】

#### オステオプロテゲリン

## 発明の分野

本発明は、一般に、骨代謝の調節に関与するポリペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであるオステオプロテゲリンと呼ばれる新規なポリペプチドに関する。該ポリペプチドは骨粗鬆症のごとき骨喪失の増大によって特徴付けられる骨の病気を治療するのに用いられる。

## 発明の背景

ポリペプチド成長因子およびサイトカインは分泌因子であって、別々の表面結合受容体に特異的に結合することによって、細胞増殖、分化および代謝における広範囲の変化をシグナル化する。蛋白質のクラスとして、受容体はそれらの構造およびシグナル変換の様式が異なる。それらは、リガンド結合に関与する細胞外ドメイン、および適当な細胞内シグナルを伝達する細胞質ドメインを有することによって特徴付けられる。受容体発現パターンは、最終的には、いずれの細胞が所与のリガンドに応答するかを決定し、所与の受容体の構造はリガンド結合によ

って誘導された細胞応答を指示する。蛋白質チロシン、または蛋白質セリン/トレオニンのリン酸化を活性化することによって(例えば、血小板由来成長因子受容体(PDGFR)またはトランスフォーミング成長因子 $-\beta$ 受容体-I(TGF $\beta$ R-I))、G-プロテイン活性化を刺激することによって(例えば、 $\beta$ -アドレナリン受容体)、および細胞質シグナル変換蛋白質との会合を調節することによって(例えば、TNFR-1およびFas/APO)、受容体はそれらの細胞質ドメインを介して細胞内シグナルを伝達することが示されている(HeIdin, Cell 80, 213-223 (1995))。

腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーは I 型膜貫通蛋白質の群であり、細胞内ドメインにおいて 3 ないし6 回反復される保存されたシステインーリッチのモチーフを有する(Smithら Се I 1 76,953-962 (1994))。押しなべて、これらの反復単位はこれらの受容体のリガンド結

合ドメインを形成する(Chenら、 Chemistry 270, 2874 -2878(1995))。これらの受容体のリガンドは、構造的に、TNF  $\alpha$  に相同な蛋白質の関連群である(Goeddelら、Cold Spring

Harbor Symp. Quart, Biol. 51, 597-609 (1986); Nagatab Science 267, 1449-1456 (1995))。 TNF  $\alpha$  は区別されるが密接に関連した受容体TNFR-1およびTNFR-2に結合する。TNF  $\alpha$  は、増殖、分化、および細胞傷害およびアポトーシスを含めた、受容体担持細胞における種々の生物学的応答を生起する(Beutlerb, Ann. Rev. Biochem. 57, 505-518 (1988))。

TNF  $\alpha$  は急性および慢性炎症反応を媒介すると信じられている(Beutler ら、Ann. Rev. Biochem. 57, 505-508 (1988) )。TNF  $\alpha$ の全身送達は毒ショックおよび広範な組織壊死を誘導する。このため、TNF  $\alpha$  は敗血症を含めた、種々の感染性疾患に関連したひどい発病率および死亡率の原因であり得る。TNFR-関連受容体Fas/APOのリガンドであるFasLにおける突然変異(Sudaら,Cell 75, 1168-1178 (1993))は自己免疫に関連するが(Fisherら Cell 81, 935-946 (1995))、FasLの過剰生産は薬物誘導肝炎に関係している可能性がある。かくして、種々のTNF

R-関連蛋白質に対するリガンドは、しばしば、多くの病気状態のひどい効果を媒介し、これはこれらのリガンドの活性を中和する薬剤が治療的価値を有することを示唆する。可溶性TNFR-1受容体、およびTNF $\alpha$ に結合する抗体が、全身TNF $\alpha$ を中和するそれらの能力についてテストされている(Loetscherら,Cancer Cells  $\underline{3(6)}$ ,221-226(1991))。分泌TNFR-1 mRNAの天然に生じる形態が最近クローン化され、その産物がイン・ビトロおよびイン・ビボでTNF $\alpha$ 活性を中和するその能力につきテストされた(Kohnoら PNAS USA 87,8331-8335

(1990))。 $TNF\alpha$ を中和するこの蛋白質の能力は、可溶性TNF受容体がTNFに結合し、それを一掃するように機能し、それにより、TNFR 一担持細胞に対する細胞傷害効果をブロックすることを示唆している。

本発明の目的は、TNFRスーパーファミリーの新しいメンバーを同定することにある。新しいファミリーメンバーは、膜貫通蛋白質、または細胞外ドメインを含み膜貫通および細胞質ドメインを欠くその可溶性形態であろうことが期待される。本発明者らは、TNFR-2に密接に関連した分泌蛋白質をコー

ドするTNFRスーパーファミリーの新しいメンバーを同定した。可溶性TNF R-1に対する類似性により、TNFR-2関連蛋白質はそのリガンドの活性を 負に調節し、かくして、ある種のヒト疾患の治療で有用であり得る。

### 発明の概要

腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーの新規なメンバーは胎児ラット腸 c DNAライブラリーから同定された。全長 c DNAクローンが得られ、配列決定された。トランスジェニックマウスにおけるラット c DNAの発現により、特に長骨、骨盤骨および椎骨において、骨密度の顕著な増加が明らかとされた。該 c DNAによってコードされたポリペプチドはオステプロテゲリン(OPG)と呼ばれ、骨蓄積を促進する役割を演じる。

本発明は、OPGの生物学的活性の少なくとも1つを有するポリペプチドをコードする核酸を提供する。図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示すマウス、ラットまたはヒトOPGをコードする核酸にハイブリダイズする核酸も提供される。好ましくは、OPGは哺乳動物OPGであって、より

好ましくはヒトOPGである。また、組換えOPGを産生する方法として、OPGを発現させるための組換えベクターおよび宿主細胞も含まれる。該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片も開示される。

また、骨疾患を治療する方法も本発明によって提供される。該ポリペプチドは 骨吸収を防止するのに有用であり、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨のパジェッ ト病、および慢性関節リウマチまたは骨髄炎等による骨喪失のごとき骨喪失の結果となるいずれの疾患を治療するのにも有用である。また、本発明の核酸を用い、アンチーセンスまたは遺伝子治療で骨疾患を治療することもできる。OPG核酸およびポリペプチドよりなる医薬組成物も含まれる。

### 図面の記載

- 図1. A. 新規EST LORFのFASTA分析。ヒトTNFR-2配列と並べた推定FRI-1アミノ酸配列を示す。B. 示された新規EST LORFのプロフィール分析はTNFR-プロフィールと並べた推定FRI-1アミノ酸配列である。C. 新規FRI-1に相同な領域を示すTNFRスーパーファミリーの構造図。
- 図3. 予測されるラットOPG蛋白質配列のPepPlot分析(Wisconsin GCG Package, Version8.1)。A. 疎水性(上方) および親水性(下
- 方) アミノ酸を示すラットOPGの模式的表示。また、塩基性(上方) および酸

性(下方)アミノ酸も示される。B. ChouおよびFasman(Adv. Enz. 47,45-147(1948))によって定義されたベーターシート形成性(上方)およびベーターシート破壊性(下方)であるアミノ酸残基の表示。C. アルファーラセンおよびベーターシートについての性質測定の表示(ChouおよびFasman、前掲)。1.00の上方の曲線はアルファーラセンまたはベーターシート構造についての性質を示す。構造は曲線が1.00よりも降下する蛋白質の領域で終了するであろう。D. アルファー形成性(上方)またはアルファー破壊性(下方)である残基の表示。E. アルファおよびベータ構造のアミノ末端で典型的に見い出される配列に似ている蛋白質配列の一部の表示(ChouおよびFasman、前掲)。F. アルファおよびベータ構造のカルボキシル末端で典型的に見い出される配列に似ている蛋白質配列の一部の表示(ChouおよびFasman、前掲)。G. ターンで典型的に見い出される蛋白質配列の一部の表示(ChouおよびFasman、前掲)。H.配列の各位置におけるラセン疎水性モーメントの表示(Eisenbe

rgらProc. Natl. Acad. Sci. USA<u>81</u>, 140-144 (1984))。I. KyteおよびDoolittle (J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982))およびGoldmanら (Ann. rev. Biophys. Biophys. Chem. <u>15</u>, 321-353 (1986))に基づく平均ハイドロバシーの表示 (Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. <u>15</u>, 321-353 (1986)に総括されている)。

図4. ヒト組織におけるOPG cDNAについてのmRNA発現パターン。ノーザンブロットは32Pー標識ラットcDNAインサート(A、左側の2つのパネル)、またはヒトcDNAインサート(B、右側パネル)でプローブした

図5. 肝細胞でOPG c D N A を発現するトランスジェニックマウスの創製。マウス肝臓におけるHE-OPGトランスジーンのノーザンブロット発現。 図6. OPGトランスジェニックマウスにおける骨密度の増加。パネルA-

F。対照マウス。G-J、OPG発現マウス。壊死において、全ての動物をX-線撮影に付し、写真を調製した。A-Fにおいて、対照動物および1のトランスジェニック

非発現体 (#28)のX-線写真を示す。骨は明瞭に規定される骨および透明な中央の骨髄腔を有することに注意されたし。対照的に、OPG (G-J)動物ははっきりとしない皮質および骨髄ゾーンにおける増大した密度を有する。

図7. OPGトランスジェニックマウスにおける柱状骨(trabecular bone の増加。A-D. 対照動物からの骨の代表的な顕微鏡写真。AおよびBにおいては、大腿の低( $4 \times 10 \times$ )出力像が示される(Masson Tricharden Tricharden

増殖プレート軟骨の残骸である。TRAP染色に基づくと、これらの動物は増殖プレート(G)に破骨細胞(矢印参照)を有し、これは数が減少し得る。しかしながら、増殖プレートからの柱状骨の表面は実質的に破骨細胞を欠き(H)、対照動物と直接的コントラストをなす(D参照)。

図8. HE-OPG発現体は単球-マクロファージ生成において欠陥を有しない。マウスにおける大理石骨病の1つの原因はM-CSF遺伝子における点突然変異による欠陥M-CSF産生である。この結果、循環および組織ベースのマクロファージの顕著な不足となる。OPG発現体の末梢血液はH1E分析によって評価して単球を含有した。組織マクロファージの存在を確認するために、ネズ

ミマクロファージ上の細胞表面抗原を認識するF480抗体を用いて免疫組織化学を行った。AおよびCは正常およびCR1過剰発現体からの脾臓の低出力(4×)顕微鏡写真を示す。両動物は多数のF480陽性細胞を有することに注意されたし。また、単球ーマクロファージも正常(B)およびHE -O PG 過剰発現体(D)の骨髄に存在した(40×)。

図9. マウスおよびヒトOPGcDNAクローンの構造お

よび配列。予測されるシグナルペプチドに下線を施し、N-結合糖鎖付加の可能な部位は太線で示す。E、F. ラット、マウスおよびヒトOPGアミノ酸配列の配列並置および比較。

図10. TRAP-1およびヒトOPGの細胞外における保存配列の比較。 実施例6に記載したTNFR1およびOPG並置のPrettyPlot(Wisconsin GCG Package,Version8.1)。頂部の線、ドメイン1-4をコードするヒトTNFR1配列。底部の線、ドメイン1-4をコードするヒトOPG配列。保存残基は矩形ボックスによって強調する。

図12. システインーリッチのドメインの構造。OPGの予測される構造を強調するヒト(頂部線 配列番号:136)およびマウス(底部線)OPGアミノ酸配列の配列。ポリペプチドは2つの半分物に、N-末端(A)およびC-末端(B)に分けられる。N-末端の半分は4つのシステインリッチドメイン(標識した1-4)を含有することが予測される。予測される鎖内ジスルフィド結合は太線(「SS1」、「SS2」、または「SS3」標識)によって示される。

チロシン28およびヒスチジン75(下線)はイオン性相互作用を形成すると予測される。OPGリガンドと相互作用すると予測されるアミノ酸は適当な残基の上方の太点によって示される。OPGのC-末端半分に位置するシステイン残基は矩形ボックスによって示される。

図13. 全長および切形 (trancated) マウスOPG-Fc融合蛋白質の発現および分泌。A. ヒトIgG1 Fcドメインへの融合点を示すマップは矢印の頭によって示される。B. F1. Fc(ロイシン401においてFcに融合した全長OPG)またはCT. Fc(チロシン180においてFcに融合したカルボキシル末端切形OPG)融合蛋白質発現ベクタ

ーいすれかのを発現する細胞から得られた馴化培地のSDS-ポリアクリルアミドゲルの銀染色。レーン1、親pCEP4発現ベクター細胞系;レーン2、F1.Fcベクター細胞系;レーン3、CT.Fcベクター細胞系。C.抗ーヒトIgG1 Fcドメイン(Pierce)でプローブしたF1.FcおよびCT.Fc融合蛋白質発現ベクターのウェスタンブロット。レーン1、親pCEP4発現ベクター細胞系;レーン2、F1.Fcベクター細胞系;レーン3、CT.Fcベクター細胞系。

図14. イー・コリ(E. coli)におけるヒトOPGの発現。A. 細菌発現ベクターの構築。ヒトOPG遺伝子のLORFはPCRによって増幅し、 次いで、オリゴヌクレオチドリンカー断片(頂部ストランドは配列番号:137 ;底部ストランドは配列番号:127)に結合させ、pAMG21ベクターDN Aに連結した。得られたベクターはN-末端メチオニン残基に連結したOPG残 基32-401を発現できる。B. pAMG21-ヒトOPG-32-401プラスミドを保有する誘導されないおよび誘導された細菌のSDS-PAGE分析。レーン1、MW標準;レーン2、誘導されない細菌;レーン3、30℃誘導;レーン4、37℃誘導;レーン5、37℃誘導か

らの全細胞溶解物;レーン6、全細胞溶解物の可溶性画分;7、全細胞溶解物の 不溶性画分;レーン8、全細胞溶解物から得られた精製封入体。 図15. SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる、CHO 細胞において産生された組換えネズミOPGの分析。等量のCHO馴化培地を示した各レーンに適用し、還元性試料緩衝液(左側レーン)、または非還元性試料緩衝液(右側レーン)いずれかでの処理によって調製した。電気泳動の後、溶解した蛋白質をナイロン膜に移し、次いで、抗-OPG抗体でプローブした。OPGの55kdモノマーおよび100kdダイマー形態の相対的位置を矢印の頭によって示す。

図16. CHO細胞で産生された組換えネズミOPGのパルスチェイス分析。CHO細胞を<sup>35</sup>Sーメチオニン/システインでパルス標識し、次いで示された時間、追跡した。代謝的に標識した培養を馴化培地および細胞両者に分離し、各々から界面活性剤抽出物を調製し、清澄化し、次いで、抗一OPG抗体で免疫沈降させた。免疫沈降物をSDSーPAGEによって解像し、フィルムに暴露した。頂部の左側および右側パネル;非還元性条件下で試料を分析した。下方の左側および右側パネ

ル;還元性条件下で試料を分析した。頂部および底部の左側パネル;細胞抽出物。頂部および底部の右側パネル;馴化培地抽出物。〇PGの55kdモノマーおよび100kdダイマー形態の相対的移動度は矢印の頭部によって示される。

図17. CTLL-2細胞系におけるOPGの発現。CTLL-2細胞およびCHO-muOPG[1-401]トランスフェクト細胞からの無血清馴化培地を調製し、濃縮し、次いで非還元性SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによって分析した。左側レーン;CTLL-2馴化培地。右側レーン;CHO-muOPG馴化培地。OPGの55kdモノマーおよび100kdダイマーの相対的移動度は矢印の頭によって示される。

図18. 対照およびOPGトランスジェニックマウスから得られた血清試料および肝臓抽出物におけるOPG発現の検出。トランスジェニックマウスは実施例4に記載したごとくに構築した。OPG発現を、SDS-PAGE、続いて抗-OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって可視化した。

図19. イン・ビトロにおける骨芽細胞に対するhuOPG [22-401

#### ] - Fc融合蛋白質の効果。示した量のhu

性と比較した。

OPG [22-401] -Fc 融合の不存在下(対照)または存在下で、破骨細胞形成アッセイを実施例 11A に記載したごとくに行った。破骨細胞形成は酒石酸酸性ホスファターゼ(TRAP)に対する組織化学的染色によって可視化した。A. OPGを 100 ng/mlまで添加。D. OPGを 0.1 ng/mlまで添加。E. OPGを 0.01 ng/mlまで添加。F. OPGを 0.001 ng/mlまで添加。G. 対照。OPG無添加。

図20. OPGの量を増大させることに伴う破骨細胞培養TRAP活性の減少。示した濃度のhuOPG [22-401] -Fc融合蛋白質を破骨細胞形成アッセイに添加し、TRAP活性を実施例11Aに記載したごとくに定量した。図21. 破骨細胞分化の終末段階に対するOPGの効果。huOPG [22-401] -Fc融合蛋白質を、破骨細胞成熟化の間(5-6日;OPG-CTL)または破骨細胞成熟化の終末段階の間(7-15日;CTL-OPG)に破骨細胞形成アッセイに添加した。TRAP活性を定量し、OPGの不存在下全体(OPG-OPG)におけるOPGの存在下(CTL-CTL)で観察された活

図23. 対照およびIL1-処理マウスにおける顕蓋冠破骨細胞に対するOPGの効果。マウス頭蓋冠骨試料を分析する組織学的方法は実施例11Bに記載する。矢印は2日に処理したマウスに存在する破骨細胞を示す。4回のPBS注入を毎日(A)、IL-1の1回注入およびPBSの3回注入を毎日(B)、P

BSの1回注入およびOPGの3回注入を毎日(C)、IL-1の1回注入およびOPGの3回注入を毎日受容するマウスの頭蓋冠試料。

図 24. 正常マウスの骨髄腔における骨蓄積のX - 線撮影分析。マウスに生理食塩水(A)または 14 日間のm u O P G [22-401] - F c 融合(5 m g / k g / d)(B)を皮

下注入し、実施例11Cに記載したごとくに骨密度を測定した。

図25. 正常マウスの骨髄腔における骨蓄積の組織形態学的分析。注入実験および骨組織学は実施例11Cにおけるごとくに行った。

図26. 正常マウスの骨髄腔における骨蓄積の組織学的分析。注入実験および骨組織学は実施例11Cに記載したごとくに行った。A. 生理食塩水。B. muOPG[22-401]-Fc融合の注入。

図27. 卵巣摘出したラットに投与されたOPGの活性。この2週間実験において、低下した骨密度に対する傾向はOPGまたは他の抗一吸収療法によってブロックされたようであるDEXA測定は卵巣摘出時および処置の1週間および2週間において行った。結果は最初の骨密度からの%変化として表す(平均値+/-SEM)。

図28. 組織形態学的方法によって測定した大腿骨幹端における骨密度は、 卵巣摘出の17日における偽手術した動物 (SHAM) よりも卵巣摘出ラット (OVX) においてより低い傾向がある。この効果はOPG-Fcによってブロックされ、OPG-Fc処理卵巣摘出ラット (OVX+OPG) はビヒクル

処理卵巣摘出ラット (OVX) よりも有意に高い骨密度を有する。 (平均値+/-SEM)

#### 発明の詳細な記載

腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーの新規メンバーを、胎児ラット膓cDNAライブラリーから単離された発現配列タッグ(EST)として同定した。全長ラットcDNAクローンおよび対応するマウスおよびヒトcDNAクローンの構造は実施例1および6に記載したごとくに決定した。ラット、マ

ウスおよびヒト遺伝子は、各々、図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示す。全ての3つの配列は、TNFRファミリーメンバーの細胞外ドメインに対して強力な類似性を示した。単離された全長cDNAクローンはいずれも、膜結合受容体につき予測されるであろう膜貫通および細胞質ドメインをコードせず、これはこれらのcDNAは細胞表面受容体よりもむしろ可溶性の分泌蛋白質をコードすることを示唆する。図9Dに示されたヌクレオチド1200-1353にわたるヒト遺伝子の一部は受託番号17188769の下に1995年11月22日にGenebankデータベースに寄託した。

ラットおよびヒトmRNAの組織分布は実施例2に記載したごとくに測定した。ラットにおいて、mRNA発現は腎臓、肝臓、胎盤および心臓で検出され、腎臓で最大の発現であった。骨格筋および膵臓における発現も検出された。ヒトにおいては、発現はリンパ節、胸腺、脾臓および虫垂と共に同組織で検出された。

ラットcDNAは、肝臓ー特異的ApoEプロモーター発現系を用いてトランスジェニックマウス(実施例3)で発現された。発現因子の分析は、特に長骨(大腿)、椎骨および偏平骨(骨盤)において、骨密度の顕著な増加を示した。骨の染色した切片の組織学的分析はひどい大理石骨病を示し(実施例4参照)、これは骨形成および吸収の間の顕著な不均衡を示し、骨および軟骨の顕著な蓄積に至った。OPG発現動物の骨における柱状破骨細胞の数の減少は、TNFRー関連蛋白質の活性のかなりの部分が骨吸収(破骨細胞によって媒介されるプロセス)を防止し得ることを示す。トランスジェニック発現因子における活性に鑑みて、ここに記載するTNFRー関連蛋白質をOPGと呼ぶ。

ラットcDNA配列を用い、マウスおよびヒトcDNAクロ

ーンを単離した(実施例 5)。293細胞におけるマウスOPGおよびイー・コリ (E.coli) におけるヒトOPGの発現は実施例 7および 8に記載される。マウスOPGはFc融合蛋白質として産生され、これはプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製された。また、実施例 7に記載するのは

、ヒトIgG1のFc領域に対する融合ポリペプチドとして、あるいは非融合ポリペプチドとしての、CHOおよび293細胞における全長および切形ヒトおよびマウスOPGポリペプチドの発現である。Fc融合ポリペプチドとしてまたは非融合ポリペプチドとしてのイー・コリにおける全長および切形ヒトおよびマウスOPGの発現は実施例8に記載される。組換えにより産生された哺乳動物および細菌OPGの精製は実施例10に記載される。

OPGの生物学的活性はイン・ビトロ破骨細胞成熟アッセイ、インターロイキン-1 (IL-1)誘導高カルシウム血症のイン・ビボモデル、および正常マウスにおける骨密度の注入実験を用いて測定した(実施例11)。CHOまたは293細胞で産生された以下のOPG組換え蛋白質はイー・コリ破骨細胞成熟アッセイで活性を示した:muOPG [22-185] -F

c、muOPG [22-194] -Fc、muOPG [22-401] -Fc、muOPG [22-401] -Fc、muOPG [22-201] -Fc、huOPG [22-201] -Fc、huOPG [22-401] -Fc、huOPG [22-201] -Fc、huOPG [22-401] -Fc。CHO細胞で産生されたmuOPG [22-180] -Fcおよびイー・コリで産生されたhuOPG met [32-401] はイン・ビトロアッセイで活性を示さなかった。

いくつかの源からのOPGはダイマーとしておよびある程度より多量体として産生された。トランスジェニックマウスで産生されたラットOPG [22-401]、CHO細胞において組換えポリペプチドとして産生されたmuOPG [22-401] およびhuOPG [22-401] 、および細胞傷害性T細胞系からの天然に生じる産物として発現されたOPGは、非還元性SDSゲルで分析した場合、圧倒的にダイマーおよびトリマーであった(実施例9参照)。アミノ酸186-401の領域に欠失を有する切形OPGポリペプチド(例えば、OPG [1-185] およびOPG [1-194] )は圧倒的にモノマーであり、これは領域186-401がOPGポリペプチドの自己会合に関与し得ることを示唆する。しかしながら、イー・コリで産生されたhuOPG met [32-401] はかな

りモノマーであった。

OPGは骨吸収の調節で重要であり得る。蛋白質はTNFファミリーの可溶性 受容体として作用するようであり、骨溶解性経路に関与する受容体ーリガンド相 互作用を妨げ得る。調節の1つの態様は破骨細胞の数の低下のようである。

### 核酸

本発明は、OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを有するポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。前記したごとく、OPGの生物学的活性は限定されるものではないが骨代謝に関与するいずれの活性も含み、特に骨密度の増大を含む。本発明の核酸は以下のものから選択される。

- a) 図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、 および9C-9D(配列番号:124)に示した核酸配列またはその相補鎖;
- b) 図2B-2C (配列番号:120)、9A-9B (配列番号:122)、 および9C-9D (配列番号:124) におけるポリペプチドーコーディング領域とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸:および
  - c)包括的に図1Aに示されるヌクレオチド148ないし3

37とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸、

d) (a) および(b) における配列に対して縮重した核酸配列。

本発明は、ラット、マウスおよびヒトOPGをコードする核酸ならびにOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するポリペプチドをコードするそれにハイブリダイズする核酸配列を提供する。また、図1Aに示されたヌクレオチド148-337を含むラットOPG ESTにハイブリダイズする核酸も提供される。ハイブリダイゼーションについての条件は、一般に、明細書の実施例1に記載された5×SSC、50%ホルムアミドおよび42℃のごとき高ストリンジェンシィである。これらの条件に対する同等のストリンジェンシィは塩および有機溶媒濃度および温度を調整することによって容易に得ることができる。(り)における核酸は、TNF受容体スーパーファミリーの他の公知のメンバーとの検出可能なハイブリダイゼーションを受けない、OPG-関連ポリペプチドをコードする配列を含む。好ましい具体例において、核酸は図2B-2C(配列番号

:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号: 124)に示されたものである。

本発明のハイブリダイズする核酸の長さは、ハイブリダイゼーションが図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示されたポリペプチドーコーディング領域の一部または全部で起こり得、また隣接する非コーディング領域でも起こり得るまで変化し得る。従って、ハイブリダイズする核酸は図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示された配列の切形および伸長形であり得る。切形または延長された核酸は本発明に含まれる。但し、それらはOPGの生物学的特性のうちの1以上を保有するものとする。また、ハイブリダイズする核酸はOPGコーディング領域に対して5,側および/または3,側にある隣接する非コーディング領域を含み得る。非コーディング領域はプロモーター、エンハンサー、翻訳開始部位、転写終止部位等のごときOPG発現に関与する調節領域を含む。

核酸についてのハイブリダイゼーション条件はSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, C

old Spring Harbor, New York (1989) に記載されている。

ラットOPGをコードするDNAは、ATCC受託番号69970の下で1995年12月27目にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpMO-B1.1中にて提供された。マウスOPGをコードするDNAはATCC受託番号69971の下で1995年12月27日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpRcCMV-ネズミOPG中にて提供された。ヒトOPGをコードするDN

AはATCC受託番号69969の下で1995年12月27日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpRcCMVーヒトOPG中にて提供された。本発明の核酸はストリンジェント条件下でATCC受託番号69969、69970、および69971のDNAインサートにハイブリダイズし、OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを有する。

また、本発明によって、図2B、9Aおよび9Bに示された

核酸配列の誘導体が提供される。ここに記載するごとく、誘導体は、得られた配列が付加され、欠失され、挿入されまたは置換された1以上のアミノ酸を有するポリペプチドをコードし、得られたポリペプチドがOPHの活性を有するように、1以上の残基の付加、置換、挿入または欠失を有する核酸配列を含む。核酸誘導体は、スプライス変化または多形のごとく天然で生じ得る、あるいは当業者に利用できる部位特異的突然変異誘発技術を用いて構築できる。OPGの天然に生じる変異体の1つの例はリーダー配列内の残基3において1ysからasnへの変化をコードする核酸である(実施例5参照)。核酸誘導体は最も生物学的活性を破壊しないらしい分子の領域におけるアミノ酸変化をコードするであろうと予測される。他の誘導体は、膜貫通および細胞質ドメインと共に図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示された細胞外ドメインを有するOPGの膜結合形態をコードする核酸を含む。

1つの具体例において、OPGの誘導体は、カルボキシル末端から1以上のアミノ酸が欠失された切形形態をコードする核酸を含む。OPGをコードする核酸はカルボキシル末端から1

ないし216個のアミノ酸を欠失し得る。所望により、抗体Fc領域を新しいカルボキシ末端から延長させて、生物学的に活性なOPG-Fc融合ポリペプチドを得ることもできる(実施例11参照)。好ましい具体例において、核酸は(図9E-Fにおけるナンバリングを用いて)22-185、22-189、22-

194または22-201からのアミノ酸配列を有するOPGをコードし、所望によりヒトIgGのFc領域をコードする。

また、アミノ末端から1以上のアミノ酸が欠失されたOPGの切形形態をコードする核酸も含まれる。切形形態はリーダー配列よりなる21個のアミノ酸の一部または全部を欠くものを含む。加えて、本発明は、(残基21において)成熟アミノ末端から1ないし10個のアミノ酸が欠失した、および所望により(残基401において)カルボキシル末端から1ないし216個のアミノ酸が欠失したOPGをコードする核酸を提供する。所望により、核酸はアミノ末端におけるメチオニンをコードしてもよい。かかるOPG切形ポリペプチドの例は実施例8に記載される。

本発明の核酸の例はcDNA、ゲノミックDNA、合成DN

AおよびRNAを含む。cDNAはOPGを発現する種々の組織から単離された mRNAから調整されたライブラリーから得られる。ヒトにおいては、OPGに ついての組織源は腎臓、肝臓、胎盤および心臓を含む。OPGをコードするゲノミックDNAは種々の種から商業的に入手可能なゲノムライブラリーから得られる。合成DNAは重複するオリゴヌクレオチド断片を化学合成し、続いて断片を組み立てて、コーディング領域およびフランキング配列の一部または全てを復元することによって得られる(インターフェロン遺伝子の化学合成を記載する米国特許第4,695,623号参照)。RNAは、T7プロモーターおよびRNAポリメラーゼを用いるベクターののような、mRNAの高レベルの合成を支持する原核生物発現ベクターにより、最も容易に得られる。

本発明の核酸配列は、いずれの細胞および組織がOPGmRNAを発現しているかを決定するために、生物学的試料中のOPG配列の検出に使用される。また、該配列はOPGに関連する配列をcDNAおよびゲノムライブラリーからスクリーニングするのにも使用される。かかるスクリーニングは、相同配列を検出するのに適したハイブリダイゼーション条件を用いる当

業者の能力内に十分にある。また、該核酸はアンチセンス療法または遺伝子療法

によってOPGレベルの発現を調節するのに有用である。また、該核酸はポノペ プチドの産生および生物学的活性の実験に使用し得るトランスジェニック動物の 開発で使用される(実施例3参照)。

### ベクターおよび宿主細胞

OPGをコードする核酸配列を含有する発現ベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞およびOPGを生産する方法も本発明によって提供される。組換え蛋白質の発現の総括はMethods of Enzymology v. 1 85, Goeddel, D. V. 編, Academic Press (1990) に見い出される。

OPGの産生のための宿主細胞はイー・コリのごとき原核生物宿主細胞、酵母、植物、昆虫および哺乳動物宿主細胞を含む。HB101およびJM101のごときイー・コリ株は発現に適している。好ましい哺乳動物宿主細胞はCOS、CHOd−、293、CV−1、3T3、ベイビーハムスター腎臓(BHK)細胞および他のものを含む。哺乳動物宿主細胞は、糖鎖付加およびポリペプチドプロセッシングのごとき翻訳後修飾がOPG

活性で重要である場合に好ましい。哺乳動物発現は増殖培地から回収し得る分泌ポリペプチドの生産を可能とする。

○PGの発現用のベクターは、ベクターの増殖およびクローン化インサートの発現に要する最小の配列を含有する。これらの配列は複製起点、選択マーカー、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー配列、RNAスプライス部位および転写終止部位を含む。前記宿主細胞における発現に適したベクターは容易に入手でき、本発明の核酸は標準的な組換えDNA技術を用いてベクターに挿入される。また、OPGの組織一特異的発現用のベクターも含まれる。かかるベクターは、マウスにおける産生のための特に肝臓、腎臓または他の器官で機能するプロモーター、および標的ヒト細胞におけるOPGの発現のためのウイルスベクターを含む。

適当な宿主ーベクター系を用い、OPGが産生される条件下で、OPGをコードする核酸配列を含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養し、次い

で発現の産物を単離することによってOPGを組換え的に産生させる。OPGはトランスフェクトされた哺乳動物細胞の上清または形質転換された細菌宿主細胞の封入体中に産生される。かく産生されたOPGは後

記するごとく当業者に知られた手法によって精製できる。哺乳動物および細菌宿主系におけるOPGの発現は実施例7および8に記載されている。哺乳動物宿主用の発現ベクターはPCT出願90/14363に記載されたpDSR $\alpha$ のごときプラスミドによって例示される。細菌宿主細胞用の発現ベクターは実施例8に記載されたプラスミドpAMG21およびpAMG22-Hisによって例示される。プラスミドpAMG21は、受託番号98113の下に、1996年7月24日にAmerican Type Culture Collection,Rockvi1le,MDに寄託した。プラスミドpAMG22-Hisは、受託番号98112の下に、1996年7月24日にAmerican Type Culture Collection,Rockvi1le,MDに寄託した。記載された特異的プラスミドおよび宿主細胞は説明目的のものであって、他の利用可能なプラスミドおよび宿主細胞もポリペプチドを発現させるのに使用できることが予測される。

また、本発明は、宿主染色体からのOPGの調節を可能とするイン・ビボおよびエクス・ビボ組換え事象による内因性核酸からのOPGの発現を提供する。内因性OPGコーディング領

域からのOPGの産生を指示できる外因性調節配列(例えば、プロモーターまたはエンハンサー)の導入によるOPGの発現も含まれる。(例えば、転写増強因子に暴露することによる)OPG産生を指示できる内因性調節配列の刺激も本発明によって提供される。

#### ポリペプチド

本発明は、骨代謝に関連した活性を有する、特に骨吸収を阻害し、それにより 骨密度を増加させる活性を有する、TNF受容体スーパーファミリーの新規メン バーであるOPGを提供する。OPGとはマウス、ラットまたはヒトOPGのア ミノ酸配列を有するポリペプチドまたはOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するその誘導体をいう。ラット、マウスおよびヒトOPGのアミノ酸配列は、各々、図2B-2C(配列番号:121)、9A-9B(配列番号:123)、および9C-9D(配列番号125)に示される。OPGの誘導体とは、得られたポリペプチドがOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するように1以上のアミノ酸の付加、欠失、挿入または置換を有するポリペプチドをいう。OPGの生物学的活性は、限定されるものではないが、骨代謝に関与する活性を含

む。好ましくは、該ポリペプチドはアミノ末端リーダー配列の21個のアミノ酸 が除去されたものであろう。

本発明によって含まれるOPGポリペプチドはラット [1-401]、ラット [22-180]、ラット [22-401]、ラット [22-401] 、ラット [22-401] ーF c 融合、ラット [1-180] ーF c 融合、マウス [1-401] 、マウス [1-180] 、マウス [22-180] 、マウス [22-180] 、ヒト [22-180] ・ ト [22-180] ・ [22-180] ・ [22-180]

例において、OPGはカルボキシ末端から1ないし約216個のアミノ酸が欠失されている。もう1つの具体例において、OPGは成熟アミノ末端(ここに、成熟アミノ末端は残基22におけるものである)から1ないし約10個のアミノ酸

が欠失されており、所望によりカルボキシ末端から1ないし約216個のアミノ 酸が欠失されていてもよい。

本発明に含まれるさらなるOPGポリペプチドは以下の:ヒト [22-180] ー F c 融合、ヒト [22-201] ー F c 融合、ヒト [22-401] ー F c 融合、マウス [22-185] ー F c 融合、マウス [22-194] ー F c 融合を含む。これらのポリペプチドはC H O I または I 2 I 3 細胞のごとき哺乳動物宿主細胞で産生される。原核生物宿主細胞で発現される本発明に含まれるさらなるOPGポリペプチドは以下の:ヒトmet I 2 I 2 I 4 I 3 I 1 I 2 I 2 I 4 I 3 I 2 I 2 I 4 I 3 I 2 I 2 I 4 I 3 I 2 I 2 I 4 I 3 I 2 I 4 I 3 I 3 I 4 I 4 I 3 I 3 I 4 I 3 I 4 I 3 I 4 I 4 I 3 I 3 I 4 I 5 I 6 I 7 I 8 I 9 I 8 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9 I 9

 れる前記OPGポリペプチドはアミノ末端メチオニン残基を有する(もし、かかる残基が示されていなければ)。特別の例において、OPG-Fc融合はEllisonら(Nuc. Acids Res. 10. 4071-4079(1982))に示された配列を有するヒトIgG $1-\gamma$ 1の227アミノ酸領域を用いて産生された。しかしながら、ヒトIgGのFc領域の変異体も使用できる。

ヒトIgG1 F c 領域に融合したカルボキシー末端OPG切形の生物学的活性の分析は、活性に必要なOPG部分は約164個のアミノ酸であることを示す。この領域はアミノ酸 22-185 を含み、好ましくは、OPGとリガンドとの物理的相互作用に影響し得るリガンド結合に重要な残基中のアミノ酸を含む。構造モデルは、増強された生物学的活性、より大きい安定性、または処方のより優れた容易性のごとき、より望ましい特性を有するアナログを定めるのを助けることができる。

また、本発明はOPGモノマーからなるOPG多量体も提供する。OPGは多量体(例えば、より大きい数のモノマーのダイマー、トリマー)として活性のようである。好ましくは、OPG多量体はダイマーおよびトリマーである。OPG多量体は

多量体形成を促進するのに十分なOPGのアミノ酸配列を有するモノマーからなり得るか、あるいは抗体F c 領域のごとき異種配列を有するモノマーからなることができる。OPGのカルボキシー末端欠失による分析は、領域186-401の少なくとも一部はOPGポリペプチドの会合に関与していることを示唆している。OPGアミノ酸186-401の領域の一部または全ての、自己会合できるアミノ酸配列での置換も本発明に含まれる。別法として、OPGポリペプチドまたはその誘導体を部位特異的突然変異誘発によってダイマーまたは多量体を形成するように修飾して、紫外線への暴露のごとき光化学架橋によって、あるいは二官能性ポリエチレングリコール等のごとき二官能性リンカー分子での化学的架橋によって、鎖内ジスルフィド結合形成のためのシステイン残基を対をなさないようにすることができる。

OPGポリペプチドの修飾は、本発明に含まれ、翻訳後修飾(例えば、N-結

合または〇ー結合炭水化物鎖、N-末端またはC-末端のプロセッシング)、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合または〇ー結合炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN-末端メチオニン残基

の付加を含む。また、ポリペプチドは、蛋白質の検出および単離を可能とするための酵素、蛍光、等方性または親和性標識のごとき検出可能な標識で修飾することもできる。

OPGのさらなる修飾はキメラ蛋白質を含み、ここにOPGは異種アミノ酸配列に融合している。異種配列は得られた融合蛋白質がOPGの活性を保持するようにするいずれの配列であってもよい。異種配列は、例えば、蛋白質の精製を助け得るFc融合のごとき免疫グロブリン融合を含む。OPGモノマーの会合を促進してダイマー、トリマーおよび他の高次多量体形態を形成させる異種配列が好ましい。

本発明のポリペプチドはOPGを発現する組織、細胞系および形質転換宿主細胞に存在する他のポリペプチドから単離され精製され、あるいは分泌蛋白質を含有する細胞培養中の成分から精製される。1つの具体例において、ポリペプチドは、細菌宿主細胞の発現産物のごとく、他のヒト蛋白質を含まない。

また、本発明により、ポリペプチドの安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少のごときさらなる利点を提供し得るOPGの化学的に修飾された誘導体が提供される(米国特許第4,179,337号参照)。誘導体化のための化学部分

はポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等のごとき水溶性ポリマーから選択できる。ポリマーは分子内のランダムな位置で、または分子内の所定の位置で修飾でき、1、2、3またはそれを超える結合した化学部分を含み得る。

ポリマーはいずれの分子量であってもよく、分岐または非分岐であってよい。 ポリエチレングリコールについては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の 容易性のため、約1kDaおよび約100kDaの間である(「約」なる語はポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は標準分子量よりも大きく、いくつかはより小さいことを示す)。所望の治療効果プロフィール(例えば、所望の持続放出の継続、もしあれば生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易性、免疫原性の程度または欠如、および治療蛋白質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果)に依存して他のサイズも使用できる。ポリエチレングリコール分子(または他の化学部分)は蛋白質の機能的または抗原性ドメインに対する効果を考慮して蛋白

質に結合させるべきである。当業者に利用できる多数の結合方法がある(例えば、引用して本明細書の一部とみなすEP 0401 384(PEGのG-CSFへのカップリング)、またMalikら、Exp.Hematol.20:1028-1035(1992)(塩化トレシルを用いるGM-CSFのPEG化を報告)。例えば、ポリエチレングリコールは遊離アミノもしくはカルボキシル基のごとき、反応性基を介して、アミノ酸残基を通じて共有結合させることができる。反応性基は活性化されたポリエチレングリコール分子がそれに結合できるものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基はリシン残基およびN-末端アミノ酸残基を含むことができ;遊離カルボキシル基を有するものはアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC-末端アミノ酸残基を含むことができる。また、スルフヒドリル基を、ポリエチレングリコール分子を結合させるための反応性基として用いることもできる。治療目的で好ましいものは、N-末端またはリシン基における結合のごときアミノ基における結合である。

N-末端を化学的に修飾した蛋白質を特別に所望することができる。本組成物の説明としてポリエチレングリコールを用い、

種々のポリエチレングリコール分子(分子量、分岐等による)から、反応ミックス中の蛋白質(またはペプチド)分子に対するポリエチレングリコール分子の割合、行うべきPEG化反応のタイプ、および選択されたN-末端をPEG化した蛋白質を得る方法を選択することができる。N-末端をPEG化した調製物を得

る方法(例えば、要すれば他のモノPEG化した部分からこのPEG化部分を分離すること)は、N-末端をPEG化した物質をPEG化された蛋白質分子から精製することによるものでよい。選択的N-末端化学修飾は還元的アルキル化によって達成でき、これは、特定の蛋白質における誘導体化で利用できる第一級アミノ基(リシン-対-N-末端)の異なるタイプの各様な反応性を付与する。適当な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーでのN-末端における蛋白質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

合成〇PGダイマーは種々の化学架橋手法によって調製できる。OPGモノマーはOPGの生物学的活性が保持または増強されるような方法で化学的に連結させることができる。蛋白質ダイマーのいずれの特性が所望されるかに応じて種々の化学架橋剤を用いることができる。例えば、架橋剤は短くて比較的リ

ジトのもしくは長くてよりフレキシダルであってよく、生物学的に可逆的であってよく、低下した免疫原性またはより長い薬物動態学的半減期を供することができるものであってもよい。

1つの例において、OPG分子は2工程合成(実施例12参照)によってアミノ末端を介して連結される。第1の工程において、OPGをアミノ末端にて化学的に修飾して保護されたチオールを導入し、これは、精製後に脱保護され、第2のOPG分子との種々の架橋剤を介する部位-特異的連結のための付着点として用いられる。アミノ末端架橋剤は限定されるものではないが、ジスルフィド結合、短鎖を用いるチオエーテル結合、二官能性脂肪族架橋剤、および種々の長さでのチオエーテル結合、二官能性ポリエチレングリコール架橋剤(PEG「ダンベル」)を含む。また、OPGダイマーのPEGダンベル合成には、「モノベル」と呼ばれるかかる合成の副産物が含まれる。OPGモノベルは遊離ポリマー末端で線状二官能性PEGにカップリングしたモノマーよりなる。別法として、OPGは、ジエチレントリアミンベンタ酢酸二無水物(DTPA)、pーベンゾキノン(pBQ)またはビト(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS³)ならびに当該分野で公知の他のもののご

とき試薬を含めた種々のアミン特異的ホモ二官能性架橋技術を介して直接架橋させることができる。また、PEGビスマレイミドのごとき種々の二官能性チオール特異的架稿剤でOPGを直接にチオレート化することもでき、また、1工程プロセスでダイマー化および/またはダンベルを達成することもできる。

OPGを天然源からおよびトランスフェクトされた宿主細胞から精製する方法も含まれる。該精製プロセスは精製蛋白質を得るための適当な順の1以上の標準的な蛋白質精製工程を使用できる。クロマトグラフィー工程は、イオン交換、ゲル濾過、疎水性相互作用、逆相、クロマトフォーカシング、抗一OPG抗体またはビオチンーストレプトアビジン親和性複合体等を使用するアフィニティークロマトグラフィーを含む。

### 抗体

また、本発明には、OPGに特異的に結合する抗体が含まれる。抗体の創製のための抗原は、全長ポリペプチドまたはOPG配列の一部にわたるペプチドであってよい。OPGと反応性のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の創製のための免疫学的手法は当業者に公知である(例えば、HarlowおよびLane,Antibodies:A Laborator

y Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y. (1988))。かく産生された抗体は標準的な酵素結合イムノソルベント検定法を用いて、結合特異性およびエピトープ認識につき特徴付ける。また、抗体は異なる種に由来する可変および定常ドメイン領域を有するキメラ抗体を含む。1つの具体例において、キメラ抗体はネズミ可変ドメインおよびヒト定常ドメインを有するヒト化抗体である。また、ヒトフレームワークにグラフト化された相補性決定領域(いわゆるCDRーグラフト化抗体)も含まれる。キメラおよびCDRーグラフト化抗体は当業者に公知の組換え法によって作成される。また、マウスにおいて作成されたヒト抗体も含まれる。

本発明の抗一〇PG抗体は〇PGを生物学的試料から精製するためのアフィニティー試薬として使用することができる(実施例10参照)。1つの方法におい

て、抗体をCnBrー活性化Sepharoseに固定化し、抗体ーSepharoseコンジュゲートのカラムを用いて、OPGを液状試料から取り出す。また、抗体は後記する方法によって生物学的試料中のO

PGを検出し定量するための診断試薬としても使用される。

### 医薬組成物

また、本発明は、医薬上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および/またはアジュバントと共に治療上有効量の本発明のポリペプチドよりなる医薬組成物を提供する。「治療上有効量」なる語は、特定の疾患および投与経路につき治療効果を供する量を意味する。組成物は液状または凍結乾燥形態ででき、種々のpH値およびイオン強度を有する希釈剤(トリス、酢酸もしくはリン酸緩衝液)、TweenまたはPolysorbateのごとき可溶化剤、ヒト血清アルブミンまたはゼラチンのごとき担体、チメロサールまたはベンジルアルコールのごとき防腐剤、アスコルビン酸またはメタ重亜硫酸ナトリウムのごとき抗酸化剤を含む。また、溶解性または安定性を増加させるための水溶性ポリマーで修飾したOPGよりなる組成物も含まれる。また、組成物は、延長された時間にわたって制御された送達のためのリポソーム、ミクロエマルジョン、ミセルまたは小胞へのOPGの導入よりなることもできる。特に、OPG組成物はヒドロゲル、シリコーン、ポリエチレン、エチレン一酢酸ビニルコポリマー、または生分解性ポリマーのごと

きポリマーマトリックスへの導入を含み得る。ヒドロゲルの例はポリヒドロキシアルキルメタクリレート(pーHEMA)、ポリアクリルアミド、ポリメルタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよび種々のポリ電解質複合体を含む。生分解性ポリマーの例はポリ乳酸(PLA)、ポリグルコール酸(PGA)、PLAおよびPGAのコポリマー、ポリアミドおよびポリアミドおよびポリエステルのコポリマーを含む。他の制御放出処方は、注入によって投与し得るマイクロカプセル、ミクロスフェア、マクロ分子複合体およびポリマービーズを含む。

特定の組成物の選択は、治療されるべき疾患、投与経路および所望の薬物動態 学パラメーターを含めた多数の因子に依存するであろう。医薬組成物に適した成 分についてのより広い展望はRemington's Pharmaceuti cal Science, 第18版, A. R. Gennaro編, Mack, E aston, PA (1980) に見い出される。

本発明の組成物は注射(皮下、静脈内または筋肉内いずれか)、または経口、 鼻孔、肺または直腸投与によって投与できる。投与経路は実際には多数の因子に 依存して選択され、当業者によ

#### って確認され得る。

また、本発明は、医薬上許容されるアジュバントと共に治療上有効量の本発明の核酸を含む医薬組成物を提供する。核酸組成物はOPGコーディング領域の一部または全てをアンチセンスまたは遺伝子治療方法の一部として細胞または組織に送達するのに適するであろう。

## 治療の方法

骨組織は身体の支持体を供し、ミネラル(大量のカルシウムおよびリン)、コラーゲン性および非コラーゲン性蛋白質のマトリックス、および細胞よりなる。骨で見い出されている3つのタイプの細胞、骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞は、それにより骨が継続的に形成され吸収される動的プロセスに関与する。骨芽細胞は骨組織の形成を促進し、他方、破骨細胞は吸収に関連する。吸収、または骨マトリックスおよびミネラルの離解は骨形成と比べて迅速で効率的なプロセスであり、大量のミネラルを骨から放出し得る。破骨細胞は骨格組織の通常の再形成およびホルモンによって誘導される吸収に関与する。例えば、吸収は細胞外流体中のカルシウムイオンの低下した濃度に応答して上皮小体ホルモンの分泌によって刺激される。対照的に、吸

収の阻害はカルシトニンの主たる機能である。加えて、ビタミンDの代謝物は上 皮小体およびカルシトニンに対する骨の応答性を改変させる。

骨格成熟の後の、骨格における骨の量は、骨形成および骨吸収の均衡(不均衡

)を反映する。ピークの骨の質量は骨格成熟後であって40代前に起こる。40 代および50代の間に、平衡はシフトし、骨吸収が支配的となる。年がゆくに伴 う骨質量の不可避的減少は男性よりも女性の方が早く開始し、いくらかの女性( 主としてコーカサスおよびアジア系のもの)では閉経後に顕著に加速される。

骨減少症は骨質量が正常レベル未満へのいずれかの減少に一般に関係する疾患である。かかる疾患は骨合成の速度の低下または骨破壊の速度の増加あるいは双方から生じ得る。骨減少症の最も通常の形態は一次骨粗鬆症(閉経後および老人性骨粗鬆症とも呼ばれる)である。骨粗鬆症のこの形態は年齢に伴う骨の普遍的喪失の結果であり、通常は、骨形成は通常速度で、骨吸収が増加した結果である。米国の白人女性の約25ないし30パーセントが症候性骨粗鬆症を発症している。45歳以上の女性において、骨粗鬆症と臀部、大腿、頸部および転子間骨折

との間に直接的関係が存在する。老齢の男性では50および70の間で症候性骨粗鬆症を発症するが、該病気は主として女性に影響を及ぼす。

閉経後のおよび老人性の骨粗鬆症の原因は知られていない。該疾患に寄与し得るいくつかの因子が同定されている。それらは、加齢に伴うホルモンレベルの変化およびカルシウムおよび他のミネラルの腸吸収の低下に帰される不適当なカルシウム消費を含む。治療は、通常、プロセスを遅延させる試みにおけるホルモン療法または規定食補足を含むものであった。しかしながら、現在、骨喪失に対する効果的な治療は存在しない。

本発明は、治療上有効量のOPGを用いて骨障害を治療する方法を提供する。 骨障害は正味の骨喪失(骨減少症または骨溶解症)によって特徴付けられるいず れの障害であってもよい。一般に、OPGでの治療は、骨吸収の速度を抑制する 必要がある場合に期待される。かくして、治療は吸収速度が正常を超えるあるい は骨吸収が正常レベルよりも低下した場合に骨吸収の速度を低下させるために行 って、骨形成の正常レベル未満を補償することができる。

OPGで治療可能な疾患は以下のものを含む:

一次骨粗鬆症、内分泌骨粗鬆症(甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、ク

ッシング症候群、および末端肥大症)、遺伝性および先天性形態の骨粗鬆症(骨 形成不全症、ホモシスチン尿症、メンケス症候群、およびライリーーデイ症候群 )および四肢の固定による骨粗鬆症のごとき骨粗鬆症。

成人および少年少女における骨のパジェット病(変形性骨炎)。

骨髄炎、または骨喪失に至る骨における感染性病巣。

固形腫瘍(乳房、肺および腎臓)に由来する高カルシウム血症および血液学的 悪性疾患(多発性骨髄腫、リンパ種および白血病)、特発性高カルシウム血症、 および甲状腺機能亢進症および腎臓機能不全に関連する高カルシウム血症。

外科手術後の、ステロイド投与に誘発された、および小腸および大脳の障害に 関連した、および慢性肝炎および腎臓病に関連した骨減少症。

外傷性負傷に関連した、またはゴシェ病、鎌状赤血球性貧血、全身性紅斑性狼瘡および他の疾患に関連した非外傷性壊死に関連した、骨壊死、または骨細胞死滅。

慢性関節リウマチによる骨減少。

歯周骨喪失。

骨溶解性転移。

OPGは骨障害の治療のために単独でまたは他の因子と組み合わせて使用できることは理解される。1つの具体例において、オステオプロテゲリンは骨形成を刺激する治療上有効量の因子と組み合わせて使用される。かかる因子は限定されるものではないがBMP-1ないしBMP-12と呼ばれる骨形態発生因子、トランスフォーミング成長因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )およびTGF- $\beta$ ファミリーのメンバー、インターロイキン-1阻害剤TNF $\alpha$ 阻害剤、上皮小体関連蛋白質およびそのアナログ、E-シリーズプロスタグランジン、(アレンドロネートその他のごとき)ビスホスホネート、およびフルオライドおよびカルシウムのごとき骨増強ミネラルを含む。

以下の実施例は本発明を十分説明するために供するが、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

実施例1

ラットOPG cDNAの同定および単離

c D N A クローニングおよび分析のための材料および方法はM a n i a t i s ら、前掲に記載されている。ポリメラーゼ鎖

反応(PCR)はPCR反応混合物(Boehringer-Mannheim)および製造業者によって特定されたプライマー濃度を用い、Perkin-Elmer9600サーモサイクラーを用いて行った。一般に、 $25-50\mu$ lの反応を94℃で変性し、続いて5秒間の94℃での20-40サイクル、5秒間の50-60℃、および3-5分間の72℃の20-40サイクルを行った。反応を72℃で3-5分間処理した。次いで、反応をManiatisら,前掲によって記載されているごとくにゲル電気泳動によって分析した。

EST分析のための胚性 d 2 0 腸から単離したmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築した(Adamsら,Science 252,1651-1656(1991))。ラット胚を切開し、全発生小腸および大腸を摘出し、PBS中で洗浄した。全細胞RNAを酸性チオシアン酸グアニジニウムーフェノールークロロホルム抽出によって精製した(ChomczynskiおよびSacchi Anal. Biochem. 162, 156-159(1987))。製造業者の推奨方法を用い、Dynabeads Oligo (dT) 25(Dynal Corp) への吸着およびそれからの溶出によって、

全RNA調製物からポリ(A+)mRNA画分を得た。Superscript プラスミド系(Gibco BRL, Gaithesburg, MD)を用いて ランダム起点cDNAライブラリーを調製した。内部NotI制限部位を含有す るランダムcDNAプライマーは以下の配列:

5 ' — A A A G G A A G G A A A A A A <u>G C G G C C G C</u> T A

CANNNNNNNT-3'(配列番号:1)

NotI

を有していた。

5 ' - T C G A C C C A C G C G T C C G - 3 ' (配列番号:
2)

3'-GGGTGCGCAGGCp-5'(配列番号: 3)

連結後、cDNAをNotIで完全に消化し、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)で抽出し、エタノール沈殿させた。次いで、懸濁したcDNAを、製造業者によって推奨されているごとくに、Superscriptプラスミド系(Gibco BRL、Gaithersburg,MD)を備えた予め作成したカラムを用い、ゲル濾過によりサイズ分画した。最大cDNA生成物を含有する2つの画分をプールし、エタノール沈殿させ、次いで、NotIおよびSalI消化したpMOBベクターDNA(Strathmanら,1991)に方向付けて連結した。連結したcDNAを、エレクトロポレーションによって、コンピテントElectroMAX DH10Bイー・コリ(Gibco BRL、Gaithersburg,MD)に導入した。自動配列分析のために、ほぼ10000の形質転換体を、アンピシリン補足LB栄養培地を含有する $20cm\times20cm$ 寒天プレート上に置いた。生起するコロニーを拾い、200m10Lープロス、7.5%グリセロール、および $50\mu$ g/mlアンピシリンを含有する96ウェルマイクロタイタープレート上に配置した

培養を37℃で一晩増殖させ、マイクロタイタープレートの二連セットを滅菌96ピン複製ツールを用いて作成し、次いで、両セットをさらなる分析のために-

80℃で貯蔵した。全長cDNAクローニングのために、ほぼ100万の形質転換体を、各々約10000クローンを含有する96の細菌アンピシリンプレート上で平板培養した。QiagenプラスミドMaxiキット(Qiagen Corp.,ドイツ国)を用いて、各プールからのプラスミドDNAを別々に単離し、PCR分析のために96のマイクロタイタープレートに配置した。

ランダム胎児ラット腸 c DNAクローンを配列決定するために、グリセロールストックを解凍し、1:25 希釈した小アリコットを蒸留した。ほぼ $3.0\mu1$  の希釈細菌培養を以下のオリゴヌクレオチドを含有する PCR 反応混合物(Boehringer-Mannheim)に添加した。

5 ' - T G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3 ' (配列番号: 4)

5 ' - CAGGAAACAGCTATGACC-3'(配列番号:5)

反応を以下のサクイル条件: 2 分間の 9 4 ℃: 5 秒間の 9 4 ℃、

5秒間の50℃、および3分間の72℃の30サイクル;4分間の72℃でサーモサイクラー(Perkin-Elmer9600)中でインキュベートした。サーモサイクラーにおけるインキュベーションの後、反応を2.0mLの水で希釈した。増幅したDNA断片を、製造業者の推奨法を用い、Centriconカラム(Princeton Separations)を用いてさらに精製した。製造業者の推奨法に従い、T3プライマー(オリゴヌクレオチド353-23;5'-CAATTAACCCTCACTAAAGG-3')(配列番号:6)、Taq色素ーターミメーター反応(Appplied Biosystems373A自動DNA配列決定器で配列決定した。

ランダムに拾った c DNAクローンから得られた 5 ' ヌクレオチド配列を翻訳し、次いで、FASTAプログラム(Pearsonら,Meth. Enzym ol. 183, (1990)) の修飾バージョンを用いて、公知の蛋白質配列の存

在するデータベースと比較した。また、Luethyら (ProteinScience 3, 139-146 (1994)) によって

修飾されたGribskovら(Proc.Natl.Acad.Sci.USA83, 4355-4359(1987))の配列プロフィール法を用い、翻訳された配列を、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリー(Smithorallow たいことにおける特異的システインーリッチの蛋白質モチーフの存在につき分析した。

FASTAおよびプロフィールサーチデータを用い、EST、FRI-1(Fetalラットインテスチンー1)をTNFRスーパーファミリーの可能な新しいメンバーとして同定した。FRI-1はほぼ600bpインサートを含有し、LORFは約150アミノ酸であった。データベースにおける最も近いマッチはヒトII型TNFR(TNFR-2)であった。比較した領域はこの150aaLORFにわたってTNFR-2およびFRI-1の間に $\sim$ 43%の相同性を示した。TNFRスーパーファミリーの第1および第3システインーリッチの反復を用いるプロフィール分析により $\sim$ 8のZスコアが得られ、これはFRI-1遺伝子が恐らくは新しいファミリーメンバーをコードすることを示す。FRI-1生成物の構造を推定するため

に、胎児ラット周 c D N A ライブラリーを全長クローンにつきスクリーニングした。以下のオリゴヌクレオチドが元のF R I -1 から誘導された。

5'-GCATTATGACCCAGAAACCGGAC-

3, (配列番号:7)

5'-AGGTAGCGCCCTTCCTCACATTC-

3 '(配列番号:8)

これらのプライマーをPCR反応で用いてプラスミドDNAの96プール(各 プールは10000の独立したcDNAクローンからのプラスミドDNAを含有 )をスクリーニングした。以下のサイクル条件:94℃における2分、1サイク ル;94℃における15秒、次いで65℃における45秒、30サイクル;65℃における7分、1サイクルでPerkin-Elmer96ウェルのサーマルサイクラーを用い、ほぼ1 $\mu$ gのプラスミドプールDNAをPCR反応混合物(Boehringer-Mannheim)中で増幅した。PCR反応生成物をゲル電気泳動によって分析した。96プラスミドDNAプールのうち13が予期された相対的分子量を持つ増幅DNA生成物を生起した。

一つの陽性プールからのDNAを用いて、前記したごとくにコンピテントE1 e c t r o MA X DH10Bイー・コリ(Gibco BRL,Gaithe r s b u r g,MD)を形質転換した。ほぼ40000の形質転換体を滅菌ニトロセルロースフィルター(BA-85、SchleicherおよびShue11)上に平板培養し、次いで、前記で得られたPCR産物の $^{32}$ PーdCTP標識バージョンを用い、コロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。フィルターを5×SSC、50%脱イオン化ホルムアミド、5×デンハート溶液、0.5%SDS、および100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA中、42℃で2-4時間プレハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを5×SSC、50%脱イオン化ホルムアミド、2×デンハート溶液、0.1%SDS、100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA、および~5ng/mlの標識プローブ中、42℃で~18時間ハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを室温にて2×SSC中で10分間、55℃にて1×SSC中で10分間、および最後に55℃にて0.5×SSC中で10-15分間洗浄した。オートラジオグラフィーに続いてハイブリダイズするクローンを検出し、次いで、二次スクリーニン

グのためにニトロセルロースフィルター上に再平板培養した。二次スクリーニングに際して、プラスミドクローン(pB1.1)を単離し、次いで、 $100\mu g$  /ml アンピシリンを含有する L - ブロス培地中で増幅させ、プラスミドDNA が得られた。 2.4kb pB1.1 インサートの両鎖を配列決定した。

pB1.1インサート配列を公のデータベースのFASTAサーチを用いて、 いずれかの存在する配列とのマッチおよび/または類似性を検出した。いずれの 公知の遺伝子またはESTに対してもマッチは見い出されなかったが、ヒトおよびマウスTNFR-2遺伝子に対してほぼ45%の類似性があった。メチオニン開始コドンはヌクレオチド配列のbp124に見い出され、続いてbp1327で終了する401aa残基をコードするLORFがあった。該401aa残基産物は、そのN-末端におけるほぼ31残基の疎水性シグナルペプチドおよびN-結合糖鎖付加の4つの可能な部位を有すると予測される。疎水性の膜を貫通する配列は、PepPlotプログラム(Wisconsin GCGpackage,version8.1)を用いては同定されなかった。次いで、推定された401aaを用いて蛋白質データベースをサーチした。再度、存在するマ

ッチはなかったが、TNFRスーパーファミリーの多くのメンバー、最も顕著にはヒトおよびマウスTNFRー2に対する強力な類似性があるようであった。TNFRースーパーファミリーの公知のメンバーとこの新規な蛋白質の配列並置をPileupプログラムを用いて調製し、次いで、Prettyplot(Wisconsin GCG package, version8.1)によって修飾した。この並置は全長FRIー1遺伝子産物と全ての他のTNFRファミリーメンバーとの間の明瞭な相同性を示した。相同領域はTNFRファミリーメンバーの細胞外ドメインにマップされ、これらの蛋白質のリガンド結合ドメインで見い出される3つまたは4つのシステインーリッチの反復に対応する。これは、FRIー1遺伝子が新規なTNFRファミリーメンバーをコードすることを示唆した。膜貫通領域が検出されなかったので、本発明者らはこれはTNFRー1由来可溶性受容体(Kohnoら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA87.8331-8335(1990))と同様に、分泌受容体であり得ると予測した。FRIー1遺伝子の明らかな生物学的活性のため、該産物をオステオプロテゲリン(OPG)と命名した。

## 実施例 2

組織におけるOPG mRNA発現パターン

複数のヒト組織ノーザンブロット(Clonetech)を32P-dCTP標

識FRI-1 PCR産物でプローブして、ヒト転写体のサイズを検出し、および発現のパターンを決定した。ノーザンブロットを、 $5\times SPE$ 、50%ホルムアミド、 $5\times デンハート溶液、<math>0.5\% SDS$ 、および $100\mu$  g/m 1 変性サケ精子DNA中、42%で2-4時間プレハイブリダイズさせた。次いで、該ブロットを、 $5\times SSPE$ 、50%ホルムアミド、 $2\times デンハート溶液、<math>0.1$  % SDS、 $100\mu$  g/m 1 変性サケ精子DNA、および5 n g/m 1 標識プローブ中、42%で18-24時間ハイブリダイズさせた。次いで、ブロットを室温にて $2\times SSC$ 中で10分間、50%にて $1\times SSC$ 中で10分間、次いで $0.5\times$ 中で10-15分間洗浄した。

ラット遺伝子から誘導されたプローブを用い、約2.4kbの相対的分子量を持つ支配的mRNA種を、腎臓、肝臓、胎盤および心臓を含めたいくつかの組織中で検出する。最高のレベルは腎臓で検出される。Mr4.5および7.5kbの大きな

mRNA種を骨格筋および膵臓で検出した。ヒト胎児組織においては、腎臓は比較的高いレベルの2. 4kb mRNAを発現することが判明した。ヒトプローブ(後記参照)を用い、これら同じ組織で2. 4kb 転写体のみが検出される。加えて、比較的高レベルの2. 4kb 転写体がリンパ節、胸腺、脾臓および虫垂で検出された。ラットおよびヒトの両オステオプロテゲリン遺伝子によって検出された転写体のサイズはラットpB1. 1 FRI-1インサートの長さとほとんど同一であり、これは、それが全長 cDNAクローンであることを示唆する。

## 実施例3

トランスジェニックマウスにおけるOPGの全身送達

ラットOPGクローンpB1. 1を鋳型として用いて、ApoE-肝臓特異的発現ベクター(Simonetら,J.Clon. Invest. 94,131 0-1319(1994)、およびPCT出願US94/11675および共有米国特許出願第08/221,767号)にサブクーニングするためにコーディング領域をPCR増幅した。各々、以下の5 および3 オリゴヌクレオチドをPCR増幅で用いた。

5'-GACTAGTCCCACAATGAACAAGTG GCTGTG-3'(配列番号: 9)

5 ' - A T A A G A A T G C G G C C G C T A A A C T A T G A A A C A G C C C A G T G A C C A T T C - 3 ' (配列番号: 10)

PCR反応混合物(Boehringer-Mannheim)を以下のごとくに処理した:1分間の94℃、1サイクル;20秒間の94℃、30秒間の62℃、および1分間のの74℃、25サイクル。増幅に続き、試料をQiagenPCRカラムで精製し、SpeIおよびNotI制限酵素で一晩消化した。消化した生成物を抽出し、沈殿させ、ApoEプロモーター発現ベクターにサブクローンした。得られたクローンHE-OPGをマイクロインジェクションに付すに先立って、それを配列決定してそれが突然変異がないことを確認した。

らの単一細胞胚を、注射針に傾角を付け、使用前にシリコン処理を施した以外は 実質的に記載されているごとくに(Brinsterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4338 (1985))注射した。胚をCO 2インキュベーター中で一晩培養し、15ないし20の2ー細胞胚を偽妊娠CD 1雌マウスの卵管に移した。

妊娠期間に続き、マイクロインジェクション処理した胚の着床から49の子供が得られた。該子供をゲノミックDNA試料中の一体化されたトランスジーンのPCR増幅によってスクリーニングした。増幅の標的領域は、発現ベクターに含まれたヒトApoEイントロンの369bp領域であった。PCR増幅で使用したオリゴは以下のものであった。

5'-GCC TCT AGA AAG AGC TGG G

AC-3'(配列番号:11)

5'-CGC CGT GTT CCA TTT ATG A

G C - 3'(配列番号: 12)

PCRについての条件は:2分間の94  $\mathbb{C}$ 、1 サイクル;1分間の94  $\mathbb{C}$ 、2 0秒間の63  $\mathbb{C}$ 、および3 0秒間の72  $\mathbb{C}$ 、3 0 サイクルであった。4 9の元の子供のうち、9 が P  $\mathbb{C}$   $\mathbb{R}$   $\mathbb{C}$ 

性トランスジェニック創始体として同定された。

ョン緩衝液中、42℃でハイブリダイゼーションを一晩行った。ハイブリダイゼーションに続き、ブロットを、各々2×SSC、0.1%SDS中、室温にて2回、次いで、各々0.1×SSC、0.1%SDS中、55℃にて5-10分間2回洗浄した。創始体および対照同腹子供におけるトランスジーンの発現をオー

トラジオグラフィーにより測定した。

ノーザンブロットデータは、トランスジェニック創始体のうち7つが検出可能なレベルのトランスジーンmRNAを発現することを示す(動物番号2、11、16、17、22、33および45)。陰性対照マウスおよび創始体のうち1つ(番号28)はトランスジーンー関連mRNAを発現しなかった。OPGは分泌蛋白質であると予測されるので、トランスジーンmRNAの過剰発現は、全身送達された遺伝子産物のレベルの現れであるはずである。PCRおよびノーザンブロット陽性マウスのうち、動物2、17および22は最高レベルのトランスジーンmRNAを発現し、宿主細胞および組織に対する広範な生物学的効果を示し得る。

# 実施例4

## OPGの生物学的活性

以下の手法に従い、5匹のトランスジェニックマウス(動物2、11、16、17および28)および5匹の対照同腹子供(動物1、12、15、18および30)を剖検および病理学的分析のために犠牲にした。安楽死に先立って、全ての動物はその同定番号を確認し、次いで、体重を測定し、麻酔し、血液を採取した。完全な血清化学および血液学パネルのために血液は血清および全血として保存した。目視切開に先立ち、致死的CO2吸入による最終安楽死の直後にX-線撮影を行った。これに続き、組織を摘出し、組織学的調査のために10%緩衝化乙n-ホルマリン中で固定化した。収集した組織は肝臓、脾臓、膵臓、胃、十二指腸、回腸、結腸、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、空腸、盲脳、直腸、副腎、膀胱、および骨格筋を含むものであった。固定に先立ち、全器官の重量を肝臓、胃、腎臓、副腎、脾臓および胸腺につき測定した。固定の後、組織をプラフィンブロックに加工し、3μmの切片を得た。ギ酸溶液を用いて骨組織を脱灰し、全ての切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し

た。加えて、ゴモリのレチクリンおよびマッソンのトリクロムでの染色をある組

織に対して行った。酵素組織学法を行って、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)、破骨細胞(単球ーマクロファージ系統の多核骨ー再吸収細胞)によって高度に発現される酵素の発現を測定した。また、BrdUおよびF480単球ーマクロファージ表面抗原についての免疫組織化学法を行って、各々、複製する細胞および単球ーマクロファージ系統の細胞を検出した。F480表面抗原発現を検出するために、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した4 $\mu$ m切片を脱パラフィン化し、脱イオン水に水和させた。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Black(Lipshaw,Pittsburgh,PA)でブロックし、ラットモノクローナル抗ーマウスF480(Harlan,Indianapolis,IN)中でインキュベートした。クロマトゲンとしてDABを用い(BioTek,Santa Barbara,CA)を用い、ビオチン化ウサギ抗ーラット免疫グロブリン、ペルオキシダーゼコンジュゲーテッドストレプトアビジン(BioGenex San Ramon,CA)によってこの抗体を検出した。切片をヘマトキシリンで逆染色した。

目視切開および内臓組織の観察により、トランスジーン発現体または対照同腹子供で異常性は見いだされなかった。器官重量の分析は、脾臓のサイズが、対照と比較してトランスジェニックマウスでほぼ38%増加していることを示す。トランスジーン発現体で血小板サイズのわずかな拡大および循環非染色細胞の増加があった。トランスジーン発現体で血小板レベルでほんのわずかな減少があった。加えて、血清尿酸、尿窒素、およびアルカリ性ホスファターゼレベルは全てトランスジーン発現体で低い傾向であった。発現体は長骨(大腿)、椎骨、および偏平骨(骨盤)を含めた骨格の放射能密度の増加を有することが判明した。発現体における大腿の相対的サイズは対照マウスと異ならなかった。

OPG発現体からの骨の染色切片の組織学的分析は、ひどい大理石骨病を示し、一次海綿からの軟骨残骸が大腿の骨幹における柱状骨内で観察された。明瞭に規定される皮質は大腿の切片では同定できなかった。正常な動物では、中心骨幹には骨髄が充填されている。また、椎骨の切片は大理石骨病変化を示し、これはOPG-誘導骨格変化が全身的であることを意味する。残りの骨髄は圧倒的に骨

髄様要素を示した。巨核球は存在した。

レチクリン染色はレチクリン沈積の証拠を示さなかった。F480 (マウスにおける単球-マクロファージ起源の細胞によって発現される細胞表面抗原) の免疫組織化学法は骨髄腔においてF480陽性細胞の存在を示した。局部的に、平坦なF480陽性細胞が柱状骨表面に直接隣接して観察できた。

柱状骨をライニングする間葉細胞は偏平で、不活性のようであった。H&EおよびTRAP染色に基づき、破骨細胞はOPG発現体における柱状骨表面では稀にしか見いだされなかった。対照的に、破骨細胞および/または軟骨吸収細胞が軟骨を吸収する成長プレートの領域で観察されたが、それらの数は対照と比較して少ないであろう。また、破骨細胞は、再形成活性が通常豊富な骨幹端の皮質表面で存在した。発現体および対照との間の圧倒的な差異は、椎骨および大腿双方における、柱状破骨細胞のかなりの減少であった。骨蓄積の程度は全肝臓RNAのノーザンブロッティングによって検出されたOPGトランスジーンmRNAのレベルに直接相関した。

OPG発現体からの脾臓は増大した量の赤脾髄を有し、造血の増大のため膨張 していた。全ての造血系統は現れていた。F480陽性細胞は、赤脾髄において 、対照およびOPG発現体

双方で存在した。発現体のうちの2つ(2および17)は肝臓内に髄外造血の病 巣を有しており、これは大理石病骨のためのようである。

胸腺、リンパ節、胃腸管、膵臓ー肝胆管、呼吸器管、生殖系、性器-泌尿器系、皮膚、神経系、心臓および大動脈、乳房、骨格筋および脂肪で観察できる異常はなかった。

## 実施例 5

マウスおよびヒトOPGcDNAの単離

マウスOPG mRNAの5'末端に対応するcDNAクローンをPCR増幅によってマウス腎臓cDNAライブラリー(CIonetech)から単離した。オリゴヌクレオチドはラットOPG cDNA配列から誘導され、それは以下

に示される。

- 5'-ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTG-
- 3'(配列番号:13)
- 5'-GTTGCACTCCTGTTTCACGGTCTG-
- 3 '(配列番号:14)
- 5' C A A G A C A C C T T G A A G G G C C T G A T G -
- 3'(配列番号:15)
- 5' T A A C T T T T A C A G A A G A G C A T C A G C -
- 3'(配列番号:16)
- 5'-AGCGCGGCCGCATGAACAAGTGGCT
- GTGCTGCG-3'(配列番号:17)
- 5' AGCTCTAGAGAAACAGCCCAGTGAC
- CATTCC-3'(配列番号:18)

このプロセスで得られた部分的および全長 c D N A 産物を配列決定した。全長産物をNotIおよびX b a I で消化し、プラスミドベクター p R c C M V (I n v i t r o g e n) に方向付けてクローン化した。得られたプラスミドを p R c C M V - M u - O P G と命名した。クローン化産物のヌクレオチド配列をラットO P G c D N A 配列と比較した。O P G L O R F にわたる 1 3 0 0 b p 領域にわたって、ラットおよびマウス D N A 配列はほぼ 8 8 % 同一である。マウス c D N A 配列は 4 0 1 a a L O R F を含有し、これをラットO P G 蛋白質配列と比較し、g a p s を除いて~9 4 % 同一であることが判明した。これは、単離されたマウス c D N A 配列はネズミ O P G 蛋白質をコードすること、および配列および構造は進化を通じて高度に保存されていることを示す。マウス O P G 蛋白質配列は同一

の推定シグナルペプチドをそのN-末端に含有し、N-結合糖鎖付加の全ての4つの可能な部位が保存されている。

部分的ヒトOPG cDNAを、以下のラットー特異的オリゴヌクレオチドを用いてヒト腎臓cDNAライブラリーからクローン化した。

- 5'-GTG AAG CTG TGC AAG AAC C
- TG ATG-3'(配列番号:19)
- 5'-ATC AAA GGC AGG GCA TAC T
- TC CTG-3'(配列番号:20)

このPCR産物を配列決定し、これを用いて、鋳型としてラムダにおけるヒト OPGゲノミッククローンを用い、ヒトcDNAの3'末端を増幅するためのプライマーを設計した。

- 5'-TCCGTAAGAAACAGCCCAGTGACC-
- 3 '(配列番号: 29)
- 5' C A G A T C C T G A A G C T G C T C A G T T T G -
- 3 '(配列番号: 2 1)

増幅された PCR 産物を配列決定し、5 、末端配列と一緒に用いて、全ヒトOPG CDNA コーディング配列を増幅するのに有用な5 、および3 、ヒトー特異的プライマーを設計した。

- A C A A G T T G 3' (配列番号: 2 2)
- 5'-AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGC
- TCAATGGC-3'(配列番号:23)

全長ヒトPCR産物を配列決定し、次いで、NotIおよびXbaIを用いて、プラスミドベクターpRcCMV(Invitrogen)に方向付けてクロ

ーン化した。得られたプラスミドをpRcCMVーヒトOPGと命名した。クローン化産物のヌクレオチド配列をラットおよびマウスOPG cDNA配列と比較した。OPG LORFにわたる1300bpにわたって、ラットおよびマウスDNA配列はヒトOPG cDNAと78-88%同一であった。また、ヒトOPG cDNA配列は401aaLORFを含有し、それをラットおよびマウス蛋白質配列と比較した。予測されたヒトOPG蛋白質は、各々、ラットおよびマウス蛋白質とほぼ85%同一、~90%同一である。ラット、マウスおよびヒト蛋白質の配列を並べると、それらは進化の間に高度に保存されていたことを示す。ヒト蛋白質はNー末端シグナルペプチド、およびNー結合糖鎖付加の5つの可能な部位を有することが予測され、そのう4つはラット

およびマウスOPG蛋白質の間で保存されている。

マウスOPGのDNAおよび予測されるアミノ酸配列を図9Aおよび9Bに示す(配列番号:122)。ヒトOPGのDNAおよび予測されるアミノ酸配列を図9Cおよび9Dに示す(配列番号:124)。ラット、マウスおよびヒトOPGアミノ酸の比較を図9Eおよび9Fに示す。

さらなるヒトOPG cDNAクローンの単離により、図9Cに示したDNA 配列の103位におけるGからCへの塩基変化の存在を明らかにした。このヌクレオチド変化の結果、図9Cに示したアミノ酸配列の3位のリシンの代わりにアスパラギンでの置換となる。この変化を有するクローンにおける配列の残りは図9Cおよび9Dのものと同一である。

# 実施例 6

OPG三次元構造モデリング

OPGのアミノ末端部分はTNFRスーパーファミリーの全ての公知のメンバーの細胞外部分と相同性を有する(図1C)。TNFRー関連遺伝子のこの領域における最も顕著なモチーフは~40アミノ酸、システインーリッチな反復配列であり、これは別の構造へと折り畳まれている(Bannerら、Cel

1 73,431-445 (1993))。このモチーフは通常4つの(範囲3

-6)タンデム反復(図1C参照)で表示され、リガンド結合に関与することが知られている(Beutlerおよびvan Huffel Science 264, 667-663(1994))。各反復は通常は6つの間隔を設けたシステイン残基を含有し、これは3つのドメイン内ジスルフィド結合(SS1、SS2およびSS3と呼ばれる)の形成に関与している(Banner, 前掲)。TNFR2、CD30およびCD40のごときいくつかの受容体において、反復ドメインのうちのいくつかは2つの鎖内ジスルフィド結合のみを含有する(SS1およびSS3)。

Luethyら(前掲)によって記載されている方法を用いて、ヒトOPG蛋白質配列をTNFR1細胞外ドメインプロフィールに対して並べ、Wisconsin Package, version8.1(Genetics Computer Group, Madison, WI)からのPrettyPlotプログラムを用いて結果をグラフ表示した(図10)。配置はドメイン1-4の形成に関与するシステイン残基の明瞭な保存を示す。次いで、この配置を用いて、鋳型としてp55 T

NFR1(Bannerら,前掲)の細胞外ドメインの公知の3-D構造を用い、ヒトOPG N-末端ドメインの三次元(3-D)モデルを構築した。これをなすために、ペプチド骨格および同一残基の側鎖の原子座標をTNFR1の結晶構造座標からコピーした。これに続き、挿入および異なる側鎖についての残りの座標を、LOOKプログラム(Molecular Applications Group,Palo Alto, CA)を用いて創製した。次いで、LOOKを用いてそのコンフォメーションエネルギーを最小化することによって3-Dモデルを良質化した。

他のTNFRファミリーメンバーとの類似性から、OPGはリガンドと結合すると思われる。OPGとそのリガンドとの相互作用をモデル化する目的で、 $TNF-\beta$ の結晶構造を用いて「OPGリガンド」の3-D表示をシミュレートした。Molscript (Kraulis, J. Appl. Cryst., <u>24</u>, 946-950, 1991)を用い、このデータをグラフ表示した(図11参照

)。3つのT N F  $\beta$  および3つのO P G  $\beta$  子でのO P G  $\beta$  リガンド複合体についてのモデルを構築し、ここに、O P G の相対的位置は結晶構造における T

NFR1と同一である。次いで、このモデルを用いて、以下のアプローチを用い、そのリガンドと相互作用し得るOPGの残基を見つけた。複合体における全ての残基および1つの単一OPGモデルの溶媒接近可能な領域を計算した。モノマーにおけるのと異なる複合体での接近性を有する残基はリガンドと相互作用するようである。

この情報を用い、ヒトおよびマウスOPGアミノ酸配列を再度並べて、システインリッチのドメイン1-4の各々よりなる配列を強調した(図12Aおよび12B参照)。各ドメインは予測できる個々の構造特徴を有する。

## ドメイン 1

SS2(C41ないしC54)およびSS3(C44ないしC62)ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有する。SS1結合はジスルフィド架橋に基づいて明らかではないが、28位で観察されたチロシンはTNFR1におけるY20と相同であり、これはドメイン形成を助けるためにH66と相互作用するのに関与することが知られている。OPGは75位に相同ヒスチジンを有し、これはOPG Y28およびH75が、TNFR1における相同残基がそうであるように、天然

蛋白質において一緒に重なることを示唆する。従って、これらの残基の双方は、 事実、生物学的活性で重要であり得、Y28までおよびそれを越えてのN-末端 OPG切形は活性を改変し得る。加えて、残基E34およびK43は、本発明者 らの3-次元モデルに基づくと結合リガンドと相互作用することが予測される。

# ドメイン 2

6つのシステインを含有し、SS1(C65ないしC80)、SS2(C83ないしC98)およびSS3(C87ないしC105)ジスルフィド結合を含有することが予測される。また、OPGのこの領域は、TNF $\beta$ との密接な接触を形成(前記参照)するTNFR1ドメイン2の一部に対応するP66-Q91か

ら伸びる領域を含み、OPGリガンドと相互作用し得る。特に、残基P66、H68、Y69、Y70、T71、D72、S73、H75、T76、S77、D78、E79、L81、Y82、P85、V86、K88、E89、L90、およびQ91は本発明者の構造データに基づくと結合リガンドと相互作用することが予測される。

## ドメイン3

SS1 (C107ないしC118) およびSS3 (C124ないしC142) ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有する。本発明者の構造データに基づくと、残基E115、L118およびK119はOPGリガンドと相互作用することが予測される。

## ドメイン4

SS1 (C145ないしC160) およびSS3 (C166ないしC185) ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有するが、ドメイン3と同様にSS2結合は含有しない。本発明者らの構造データはE153およびS155はOPGリガンドと相互作用すると予測する。

かくして、OPGについての予測される構造モデルは、その生物学的活性に重要であるらしい高度に保存された多数の残基を同定する。

## 実施例7

哺乳動物細胞における組換え分泌OPG蛋白質の産生

OPGが現実に分泌蛋白質であるかどうかを判断するために、マウスOPG cDNAをタッグとしてヒトIgG1 Fcド

メインに融合させ(Caponら,Nature 337,525-531(1989))、ヒト293繊維芽細胞で発現させた。Fc融合はベクターpFc-A3を用いて行った。<math>pFc-A3は、ヒンジドメインの最初のアミノ酸(G1u-99)からカルボキシル末端までのヒト免疫グロブリン $IgG-\gamma1$ 重鎖(E11isonら,前掲)のFc部分をコードする領域を含有し、<math>5'-NotI融合部位および3'-SalIおよびXbalI部位が隣接する。プラスミドは

5 ' A T A G C G G C C G C T G A G C C C A A A T C T T G
T G A C A A A A C T C A C 3 ' (配列番号: 2 4)

は、 $IgG-\gamma$ 1のヒンジドメインの最初の残基(Glu-99)の直ぐ5<sup>\*</sup>側のNotI部位に導入した。3<sup>\*</sup>プライマー:

は、SalIおよびX bal I 部位に導入した。717-bpPCR 産物をNot I およびSalIで消化し、1%アガロース(FMC Corp.)を通す電気 泳動によって単離し、Geneclean 手法(BIO 101, Inc.)に よって精製し、NotI、SalI-消化pBluescript II KS ベクター(Stratagene)にクローン化した。得られたプラスミドpF c-A3 中のインサートを配列決定してPCR 反応の信頼性を確認した。

プラスミドpRcCMV-MuOPGにおけるクローン化マウスcDNAを、以下の2セットのプライマー対を用いて増幅した。

5 ' - C C T C T G A G C T C A A G C T T C C G A G G A C C A C A A T G A A C A A G - 3 ' (配列番号: 2 6)

5 ' - C C T C T G C G G C C G C T A A G C A G C T T A T T T T C A C G G A T T G A A C C T G - 3 ' (配列番号: 2

7)

対 2

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3'(配列番号: 28)
5'-CCTCTGCGGCCGCTGTTGCATTTCCTTTCC

第1の対は全OPG LORFを増幅し、Fc融合ベクターpFcA3中の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を生じる。pFcA3はヒトIgG1 FccDNAのアスパラギン酸残基216の5,側にNotI制限部位を作成することによって調製した。この構築体はOPG蛋白質およびIgGFc領域の間の結合にわたる2つの重要でないアミノ酸をコードするリンカーを導入する。この産物は、Fc部分に連結されると、全ての4010PG残基、すぐに続いてのヒトIgG1

OPG残基401およびヒトFc領域のアスパラギン酸残基221を連結する アミノ酸配列結合は以下のごとくに修飾できる。ヒトFc領域の残基216−2 20をコードするDNAを後記するごとくに欠失させることができるか、あるいはヒトFc領域のC220に対応するシステイン残基をセリンまたはアラニンいずれかに突然変異させることができる。これらの修飾ベクターによってコードされたOPF-Fc融合蛋白質はヒト293細胞、またはCHO細胞にトランスフェクトでき、組換えOPG-Fc融合蛋白質を後記するごとく精製できる。

両産物をプラスミドベクター p C E P 4 (Invitrogen) に方向付けてクローン化した。 p C E P 4 はエプスタンーバールウイルスの複製起点を含有し、それは 2 9 3 - E B N

A-1細胞においてエピソーム複製できる。製造業者の推奨法を用い、親p C E P 4 、およびp C E P 4 一F 1 . F c およびp C E P 4 一C T . F c ベクターを 2 9 3 - E B N A - 1 細胞にリポフェクトした。次いで、トランスフェクトした 細胞を 1 0 0  $\mu$  g / m 1 ヒグロマイシン中で選択して、ベクターにつき選択し、得られた薬剤ー耐性集団培養を密集するまで増殖させた。次いで、細胞を無血清 培地中で 7 2 時間培養し、馴化培地を取り出し、S D S - P A G E によって分析した。ポリアクリルアミドゲルの銀染色は、薬剤耐性 2 0 3 培養によって産生された主要馴化培地蛋白質を検出する。p C E P 4 - F 1 . F c およびp C E P 4 - C T . F c 馴化培地において、予測される唯一のバンドが豊富に分泌された(図 1 3 B および 1 3 C 参照)。全長 F c 融合蛋白質は高濃度まで蓄積し、これはそれが安定であることを示す。両F c 蛋白質はウェスタンブロット上で抗ーヒト I g G F c 抗体(P i e r c e)によって検出され、これはそれらが組換え O P G 産物であることを示す。

製造業者の推奨法を用い、全長OPG-Fc融合蛋白質をプロテイン-Aカラムクロマトグラフィー(Pierce)によって精製した。次いで、Matusdairaら(J.Bio

1. Chem. 262, 10-35 (1987)) によって実質的に記載されているごとくに、自動エドマン分解によって、蛋白質をN-末端配列分析に付した。以下のアミノ酸配列が19 サイクル後に読まれた。

NH2-ETLPPKYLHYDPETGHQLL-CO2

H (配列番号: 3 1)

この配列はアミノ酸残基 22 で始まる予測されるマウス OPG アミノ酸配列と同一であり、このことは天然哺乳動物リーダー切断部位が元々予測されたアミノ酸残基 Y31-D32 の間ではなく Q21-E22 の間にあることを示唆する。PCEP4-F1. Fc および PCEP4-CT. Fc にて 293-EBNA 細胞で行った発現実験は、OPG が分泌蛋白質であり、そのリガンドに結合するように全身的に作用し得ることを示している。

muOPG[22-180]-Fc およびmuOPG[22-401]-Fc 融合を構築し発現させるのに用いたのと同様の手法をさらなるマウスおよびヒト OPG-Fc 融合蛋白質で使用した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸1-185 [m

uOPG Ct (185)·Fc] をコードするネズミOPG cDNAを以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCMVMu オステオプロテゲリンからのネズミOPG cDNA (実施例 5 に記載) を、後記するごとくポリメラーゼ鎖反応において以下のプライマー対を用いて増幅した。

1 3 3 3 - 8 2 :

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'(配列番号: 32)

 $1 \ 3 \ 3 \ 3 - 8 \ 0$ :

5 ' - C C T C T G C G G C C G C A C A C A C G T T G T C A T G T G T T G C - 3'(配列番号:33)

このプライマー対は、図9Aに示すごとく、OPGリーディングフレームのア ミノ酸残基63-185 (bp278-645に対応)をコードするネズミOP G c D N A 領域を増幅する。 3 、プライマーはF c 融合ベクター p F c A 3 の 枠内 N o t I 部位に適合する N o t I 制限部位を含有する。また、産物は b p 4 3 6 に位置する唯一の E c o R I 制限部位に及ぶ。増幅された P C R 産物を精製 し、N o t I および E c o R I で切

断し、得られたEcoRI-NotI制限断片を精製した。ネズミ1-4010 PG-Fc融合インサートを有するベクターpCEP4をEcoRIおよびNotIで切断し、精製し、前記で生じたPCR産物に連結した。得られたpCEP4ーベースの発現ベクターはOPGH残基1-185、直ぐに続いてのヒトIgG1 Fc領域の全ての227Fミノ酸残基をコードする。ネズミOPG1-185. Fc融合ベクターを293m胞にトランスフェクトし、薬剤選択し、馴化培地を前記したごとくに生産した。得られた分泌ネズミOPG1-185. Fc 融合産物を、製造業者の推奨法を用い、プロテイン-Aカラムクロマトグラフィー (Pierce) によって精製した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸残基1-194(muOPG C t (194). Fc) をコードするネズミOPG DNAを以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCMV Mu-オステオプロテゲリンからのネズミ<math>OP G cDNAを、以下のプライマー対を用いて増幅した。

1 3 3 8 - 8 2 :

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'(配列番号:34)

1 3 3 3 - 8 1 :

5'-CCT CTG CGG CCG CCT TTTGCCG TGG CTT TTTGCCG TGG CTT TTTTGCG TGT T-3'(配列番号:35)

このプライマー対はOPGリーディングフレームのアミノ酸残基70-194 (bp298-672に対応)をコードするネズミOPG cDNAを増幅する 。3、プライマーはFc融合ベクターpFcA3の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を含有する。また、生成物はbp436に位置する唯一のEcoRI制限部位に及ぶ。増幅されたPCR産物を前記したごとくにネズミOPG[1-401]Fc融合ベクターにクローン化した。得られたpCEP4ーベースの発現ベクターはOPG残基1-194、直ぐに続いてのヒトIgG1 Fc領域の全ての227アミノ酸残基をコードする。ネズミOPG1-194.Fc融合ベクターを293にトランスフェクトし、薬剤選択し、馴化培地を生産した。得られた分泌融合産物を、製造業者の推奨法を用い、プロテインーAカラムクロマトグラフィー(Pierce)によって精製した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸1-401をコ

ードするヒトOPG DNAは以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCM V-huオステオプロテゲリンにおけるヒトOPG DNA (実施例5に記載) を以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した。

1254 - 90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG
GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'

(配列番号: 36)

1254 - 95:

5'-CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTA CTG AAT GG-3'(配列番号:37)

得られたPCR産物は、全長ヒトOPG蛋白質をコードし、Fc融合ベクター FcA3の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を生じる。該PCR産物を前記したごとくにプラスミドベクターpCEP4に方向付けてクローン化する。得られた発現ベクターはヒトOPG残基1-401、直ぐに続けてのヒトIgG1 Fc領域の227アミノ酸残基をコードする。馴化培地をトランスフェ

クトし薬剤選択した細胞から生産し、

製造業者に推奨法を用い、プロテイン-Aカラムクロマトグラフィー (Pierce)によってhuOPG F1. Fc融合産物を精製した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸残基1-201をコードするヒト OPG DNA [huOPG Ct(201). Fc] は以下のごとくに構築した。プラスミドpRrCMV-huオステオプロテゲリンからのクローン化ヒトOPG cDNAを、以下のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて増幅した。1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG

GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'

(配列番号: 38)

1254 - 92:

5'-CCT CTG CGG CCG CCA GGG
TAA CAT CTA TTC CAC-3'(配列番号:

このプライマー対は O P G リーディングフレームのアミノ酸残基 1 - 2 0 1 を コードするヒト O P G c D N A 領域を増幅

し、Fc融合ベクターFcA3の枠内NotI部位に適合する3'末端における NotI制限部位を生じる。この産物は、Fc部に連結すると、OPG残基1-201、直ぐに続いてのヒトIgG1 Fc領域の全での221アミノ酸残基を コードする。PCR産物を前記したごとくにプラスミドベクターpCEP4に方向付けてクローン化した。トランスフェクトし、薬剤選択した細胞から馴化培地を生産し、製造業者の推奨法を用い、hu OPG Ct (201). Fc 融合産物をプロテイン—Aカラムクロマトグラフィー(Pierce)によって精製した。

以下の手法を用いて、未融合マウスおよびヒトOPGを構築し発現させた。

pRcCMV MuーオステオプロテゲリンからのネズミOPG cDNAのPCR増幅によって、全長ネズミOPG (残基1-401) の哺乳動物発現用のプラスミドを調製し、発現ベクターpDSR $\alpha$  (DeClerkら, J. Biol. Chem. 266, 3893 (1991)) にサブクローンした。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

1295-26:

5 ' - C C G A A G C T T C C A C C A T G A A C A A G T G G C T G T G C T G C - 3 ' (配列番号:40)

1295-27:

5'-CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G-3'(配列番号:41)

ネズミOPG全長リーディングフレームを前記したごとくにPCRによって増幅した。PCR産物を精製し、製造業者の推奨する条件下で、制限エンドヌクレアーゼHindIIおよびXbaI(Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN)で消化し、次いで、HindIIおよびXbaI消化のpDSRaに連結した。組換えクローンを制限エンドヌクレアーゼ消化によって検出し、次いで、配列決定してPCR増幅工程の間に突然変異が生じなかったことを確認した。

得られたプラスミド $pDSR\alpha-muOPG$ をカルシウム媒介トランスフェクション(Wiglerら、Cell <u>11</u>, 233(1977))によってチャイニーズハムスター卵巣(C

H〇)細胞に導入した。個々のコロニーを、プラスミドベクター中のジヒドロ葉

酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子の発現に基づいて選択し、いくつかのクローンを単離した。ネズミOPG組換え蛋白質の発現をCHO細胞馴化培地のウェスタンブロット分析によってモニターした。高発現細胞を選択し、OPG発現を記載されているごとくに(DeClearkら、前掲)メトトレキセートでの処理によってさらに増幅した。CHO細胞系からの馴化培地を、組換え分泌ネズミOPG蛋白質のさらなる精製のために生産した。

全長ヒトOPG(アミノ酸 1-401)の哺乳動物発現用のプラスミドは、p R c C M V -h u オステオプロテゲリン中の c D N A を直接ベクター p D S R  $\alpha$  (D e C 1 e a r k b, 前掲)にサブクローンすることによって得た。 p R c C M V - O P G プラスミドを N o t I で完全に消化し、クレノウで平滑末端とし、次いで、X b a I で完全に消化した。ベクター D N A を H i n d I I I で消化し、クレノウで平滑末端とし、次いで、X b a I で消化し、次いで、O P G 1 C D N A の適切な向きを確認した。

得られたプラスミド $pDSR\alpha-huOPG$ を前記したごとくにチャイニーズ ハムスター卵巣(CHO)細胞に導入した。プラスミドベクター中のジヒドロ葉 酸レダクターゼ(DHFR)の発現基づいて個々のコロニーを選択し、いくつか のクローンを単離した。CHO細胞馴化培地のウェスタンブロット分析によって、ヒトOPG組換え蛋白質の発現をモニターした。高発現クローンを選択し、メトトレキセートでの処理によってOPG発現をさらに増幅した。蛋白質精製のために、ヒトOPGを発現するCHO細胞系から馴化培地を生産した。

残基1-185をコードするネズミOPG用の発現ベクターは以下のごとくに構築した。pRcCMV-MuOPGからのネズミOPGcDNAを、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した。

1 3 3 3 - 8 2 :

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT

C T T - 3 '(配列番号: 4 2)

 $1\ 3\ 5\ 6\ -\ 1\ 2$  :

5'-CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC-3'(配列

番号: 43)

胞からの馴化培地を前記したごとくに生産した。

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT

C T T - 3 '(配列番号: 4 4)

1356 - 13:

5'-CCT CTG TCG ACT TAC TTT
TGC GTG GCT TCT CTG TT-3'(配列 番号:45)

このプライマー対はOPGリーディングフレーム(bp 298-672)をコードするネズミOPG cDNA領域を増幅し、リシンコドン(K194)の直後の人工的停止コドンを含有し、これに続いて人工的にSalI制限エンドヌクレアーゼ部位がある。予測される産物は予め存在するベクターへサブクローンするのに有用な内部EcoRI制限部位を含有する。PCR増幅後、得られた精製産物をEcoRIおよびSalI制限エンドヌクレアーゼで切断し、大きな断片をゲル精製した。次いで、精製産物を前記したpBluescript-muOPG.F1.FcのEcoRIおよびSalI消化物の大きな制限断片にサブクローンした。得られたプラスミドをHidI

IIおよびXhoIで消化し、小さな断片をゲル精製した。残基1-185をコードするオープンリーディングフレームを含有するこの断片を次いで発現ベクターpCEP4のHidIIIおよびXhoI消化物にサブクローンした。得られたベクターpmuOPG[1-185]は194位におけるリシンで終わる切形 OPGポリペプチドをコードする。トランスフェクトし、薬剤選択した細胞からの馴化培地を前記したごとくに生産した。

残基22ないし32の間のOPGのアミノ酸置換または欠失を導入するいくつかの突然変異をhuOPH[22-401]-Fc遺伝子の5'末端に生じさせた。全ての突然変異は、製造業者の推奨する条件を用い、「QuickChange™部位特異的突然変異誘発キット」(Stratagene,San Diego,CA)で生じさせた。略言すれば、huOPG[22-401]-FcプラスミドDNA鋳型および突然変異原性プライマーを含有する反応ミックスををデオキシヌクレオチドの存在下でPfuポリメラーゼで処理し、次いで、前記したごとくにサーモサイクラーで増幅した。次いで、反応のアリコットを、熱ショックによってコンピテント・イー・コリ

XL1-Blueにトランスフェクトし、次いで平板培養した。トランスフェクタントからのプラスミドDNAを配列決定して突然変異を確認した。

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子の残基  $2\ 2-2\ 6$  を欠失し、  $huOPG[2\ 7-4\ 0\ 1]-Fc$  融合蛋白質が産生された。

 $1 \ 4 \ 3 \ 6 - 1 \ 1$  :

5'-TGG ACC ACC CAG AAG TAC CTT CAT TAT GAC -3'(配列番号:140)

1436-12:

5'-GTC ATA ATG AAG GTA CTT CTG GGT GGT CCA-3'(配列番号:141)

以下のプライマー対を用いてヒトOPG遺伝子の残基 22-28 を欠失し、その結果、huOPG[29-401]-Fc 融合蛋白質が産生された。

 $1\ 4\ 3\ 6\ -\ 1\ 7$ :

5 ' - G G A C C A C C C A G C T T C A T T A T G A C G A A G A A A C - 3 '(配列番号: 1 4 2)

1436 - 18:

5'-GTT TCT TCG TCA TAA TGA AGC TGG GTG GTC C-3'(配列番号: 14 3)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子の残基22-31を欠失させ、その結果、huOPG[32-401]-Fc融合蛋白質が産生された。 1436-27: 5'-GTG GAC CAC CCA GGA CGA AGA AAC CTC TC-3'(配列番号:144)

1436-28:

5'-GAG AGG TTT CTT CGT CCT GGG TGG TCC AC-3'(配列番号:145)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子のコドンを変化させてチロシン残基28をフェニルアラニンに変えた。その結果、huOPG[22-401]-Fc Y28F融合蛋白質が産生された。

1436 - 29:

5'-CGT TTC CTC CAA AGT TCC TTC ATT ATG AC-3'(配列番号:146)

1436-30:

5'-GTC ATA ATG AAG GAA CTT TGG AGG AAA CG-3'(配列番号:147)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子のコドンを変えて、プロリン 残基26をアラニンコドンに変化させた。その結果、huOPG[22-401]-Fc P26A融合蛋白質が産生された。

1429 - 83:

5'-GGA AAC GTT TCC TGC AAA GTA CCT TCA TTA TG-3'(配列番号: 1 48)

1429 - 84:

5'-CAT AAT GAA GGT ACT TTG CAG GAA ACG TTT CC-3'(配列番号: 1

次いで、適当な突然変異を含有する各得られたmuOPG[22-401]ー Fcプラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、前記したごとく突然変 異体OPG-Fc融合蛋白質

を馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したイン・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。

実施例8

イー・コリにおけるOPGの発現

A. 細菌発現ベクター

# p A M G 2 1

発現プラスミド p A M G 2 1 は、米国特許第4,710,473号に記載されたAmgen発現ベクターから誘導されるAmgen発現ベクターp C F M 1656(ATCC番号69576)から誘導できる。p C F M 1656プラスミドは、記述されているp C F M 836プラスミド(米国特許第4,710,473号)から次のように誘導できる:(a) T 4ポリメラーゼ酵素で末端を満たし、続いて平滑末端連結することによって2つの内因性N de I 制限部位を破壊し、次いで、(b)合成P L プロモーターを含有する唯一のA at I I およびC 1 a I 制限部位の間のD N A 配列を、P L プロモーターを含有するp C F M 636(米国特許第4,710,473号)から得られた同様の断片で置き換え、

KpnI

AatII

- -AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA--TTTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACTGTATTT-
- -TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3, (配列番号:53)
- -ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5'(配列番号:54)

ClaI

次いで、(c)唯一のClaIおよびKpnI制限部位の間の小さな配列を以下のオリゴヌクレオチド:

5' CGATTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3'

3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'

(配列番号:49)

ClaI

で置き換える。

次いで、発現プラスミドpAMG21は、PCR重複オリゴ突然変異誘発およびDNA配列置換によって、一連の部位特異的塩基変化を作成することにより<math>pCFM1656から誘導できる。プラスミド複製プロモーターPcopBの直ぐ5,側のBgIII部位(プラスミドbp#180)で出発し、プラスミド複製造伝子に向けて進行し、塩基対変化は以下の通りである。

p AM	1G21 bp #	p CFM1656 における bp	pAMG21 における以下のものへの bp 変化
*	204	T/A	C/G
#	428	A/T	G/C
#	509	G/C	A/T
#	617	<del>-</del>	2の G/C bp 挿入
#	679	G/C	T/A
#	980	T/A	C/G
#	994	G/C	A/T
	1004	A/T	C/G
	1007	C/G	T/A
	1028	A/T	T/A
#	1047	C/G	T/A
#	1178	G/¢	T/A
#	1466	G/C	T/A
# :	2028	G/C	bp 欠失
# :	2187	C/G	T/A
# :	2480	A/T	T/A
# :	2499-2502	AGTG	GTCA
		TCAC	CAGT
# :	2642	TCCGAGC AGGCTCG	7bp 欠失
# :	3435	G/C	A/T
# 3	3446	G/C	A/T
# 3	3643	A/T	T/A

唯一のAatII (pCFM1656中位置#4364) およびSacII (pCFM1656中位置#4585) 制限部位の間のDNA配列を以下のDNA配列で置き換える。

[Aatii 粘着末端] (pAMG21 における位置#435&

- 5' GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
- 3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGG-
- -CCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT--GGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-
- -GGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGC--CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCG-

### AatII

- -TTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC--AAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG-
- -AAAATTTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG-

- -GGTTTGTTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC--CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCACTGGCACGCGAATG-
- -TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTCCTTCGCATGCCCACGCTAAAC-
- -ATGTCGGATTATAAAAACTTTATAGGGTTCTCGAAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTTG-
- -ATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTTGATTATTATTTTCCTATATTTTTTTC-
- -GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTCATACACGCATGTAAAAATA--CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTTAT-
- -AACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCAAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
- -TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTCGTAAGGCTTCGGTAATA-
- -TAGCAGTATGAATAGGGAAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTCGCTTCTTTAA-
- -ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-
- -TTACATTTGGAGATTTTTTTTTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG--AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAACAAAAGTTTATAAAGGTTAATTAGCCAC-
- -AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT--TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAATAATTTAATCGCAGTAGTA-
- -AATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATAG--TTATAACGGAGGTAAAAAATCCCATTAATAGGTCTTAACTTTATAGTCTAAATTGGTATC-
- -AATGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAG-
- -TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTTATTATAAGTGTTACATGGTAAAATCAGTATAGTC-

- -GCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA--CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTTGCCATTATCTAACTGTAAACTAAGATTATT-
- -ATTGGATTTTTGTCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTG--TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACTTTATGTTAACAAATTGTATTCATGGAC-
- -TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAATGGTTTGTTATAGTCGATTAATCGATTTGATT--ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTTACCAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-
- -CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGA--GATCTAAACAAATTGATTAATTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-

- -GCTCACTAGTGTCGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA--CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTT-
- -GAAGAAGAAGAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCCACCGCTGAGCAATA--CTTCTTCTTCTTCTGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-
- -ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGG--TGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAAACGACTTTCCTCC-
- -AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3' 「Sacli 粘着末端] (配列番号:50)
- -TTGGCGAGAAGTGCGAGAAGTG 5' (pAMG21 における位置#5904(配列番号: 4 6)

この置換DNA配列の粘着末端の連結の間に、AtaIIおよびSacII部 位の外部は破壊される。置換DNAには唯一のAatIIおよびSacII部位 がある。

### pAMG22-His

発現プラスミドpAMG22-Hisは、pAMF22の唯一のNdeI(#4795) およびEcoRI(#4818) 制限部位の間の小さなDNA配列を以下のオリゴヌクレオチドデュプレックスで置き換えることによって、Amgen発現ベクターpAMG22から誘導できる。

3' ACTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTACGATCGCAATTGCGCAACCTTAA 5'(配列番号:52)

MetLysHisHisHisHisHisHisHisAlaSerValAsnAlaLeuGlu (配列番号: 168)

#### p A M G 2 2

発現プラスミド p A M G 2 2 は、1 9 8 7 年 1 2 月 1 日に許可された米国特許第4,7 1 0,4 7 3 号に記載された A m g e n 発現ベクター系から誘導されるA m g e n 発現ベクター p C F M 1 6 5 6 (A T C C # 6 9 5 7 6) から誘導できる。 p

CFM1656プラスミドは、記述されているpCFM836(特許番号第4,710,473号)から次のように誘導できる: (a) T4ポリメラーゼ酵素で末端を満たし、続いて平滑末端連結することによって2つの内因性NdeI制限部位を破壊し、次いで、(b) 合成PLプロモーターを含有する唯一のAatIIおよびClaI制限部位の間のDNA配列を、PLプロモーターを含有するpCFM636(米国特許第4,710,473号)から得られた同様の断片で置き換え、

AatII

- -AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
- -TTTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACTGTATTT-
- -TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3, (配列番号:53)
- -ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5' (配列番号:54)

ClaI

次いで、(c)唯一のClaIおよびKpnI制限部位の間の小さな配列を以下のオリゴヌクレオチド:

- 5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3'(配列番号:55)
- 3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'(配列番号:56)
  Clai Kpni

で置き換える。

次いで、発現プラスミドpAMG22は、PCR重複オリゴ突然変異誘発およびDNA配列置換によって一連の部位特異的塩基変化を作成することにより<math>pCFM1656から誘導できる。プラスミド複製プロモーターPcopBの直ぐ5 側のBg1II部位(プラスミドbp#180)で出発し、プラスミド複製遺伝子に向けて進行し、塩基対変化は以下の通りである。

pAMG22 bp #	pCFM1656 における bp	pAMG22 における以下のものへの bp 変化
# 204 # 428 # 509 # 617	T/A A/T G/C	C/G G/C A/T 2のG/C bp 挿入
# 679 # 980 # 994 # 1004 # 1007 # 1028 # 1047 # 1178 # 1466 # 2028 # 2187 # 2480	G/C T/A G/C A/T C/G A/T C/G G/C G/C G/C C/G A/T	T/A C/G A/T C/G T/A T/A T/A T/A ba 欠失 T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	7 bp 欠失
# 3435 # 3446 # 3643	G/C G/C A/T	A/T A/T T/A

唯一のAatII (pCFM1656における位置#4364) およびSacII (pCFM1656における位置#4585) の間のDNA配列を以下のDNA配列で置き換える。

[AatII 粘着末端]

(pAMG22 における位置#4358)

- GCGTAACGTATGCATGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAA-3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGGGGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTT-
- -AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGG--TTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCGGCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCC-
- -CCCGGAGGGTGGCGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG--GGGCCTCCCACCGCCCGTCCTGCGGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGTCTTC-
- -GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTTCTAAAT--CGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCAAAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTA-

#### AatTI

- -ACATTCAAATATGGACGTCTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAATTC--TGTAAGTTTATACCTGCAGAGTATTAAAAATTTTTTAAGTAAACTGTTTACGATTTTAAG-
- -TTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGATTTGATTCTAGATTTGTTT--AACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGCTAAACTAAGATCTAAACTCA-
- -TAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGAGCTCACTAGTGT--ATTGATTAATTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCTCGAGTGATCACA-

#### SacII

- -CGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA -GCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTTCTTCTTCTT-
- -GAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC--CTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGG-
- -CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACCGCTCTTCA--GGAACCCCGGAGATTTGCCCAGAACTCCCCAAAAAACGACTTTCCTCCTTGGCGAGAAGT-
- -CGCTCTTCACGC 3 (配列番号:58) -GCGAGAAGTG 5'(配列番号:57)

[SacII 粘着末端] (pAMG21 における位置#5024)

この置換DNA配列の粘着末端の連結の間に、AatIIおよびSacII部 位の外部は破壊される。置換DNAには唯一のAatIIおよびSacII部位 がある。

### B. ヒトOPG Met [32-401]

この実施例では、使用した発現ベクターは p A M G 2 1、すなわち 1 u x P Rプロモーター(1ux発現系の記載については米国特許第5,169,318 号参照)から下流の遺伝子の挿入のための適当な制限部位を含有するpCFM1 656(ATCC受託番号69576)の誘導体であった。使用した宿主細胞は GM120 (ATCC受託番号55764) であった。この宿主は1acIQプ ロモーターおよび原核生物イー・コリK12宿主の宿主染色体中の第2の部位に

挿入された Lac I遺伝子を有する。他の通常に使用されるイー・コリ発現ベクターおよび宿主細胞も発現に適する。

N-末端メチオニンおよびヒトOPGポリペプチドのアミノ酸32-401に つきコードするDNA配列を、以下のごとく、プラスミド発現ベクターpAMG 21中の1uxPRプロモーターの制御下に置いた。これを達成するために、ヒトOPG cDNAを含有するプラスミドpRcCMV-Hu OPG D

NAを鋳型として用い、各サイクルが20秒間の94℃、続いて30秒間の37℃、続いて30秒間の72℃である30サイクルの熱サイクルを行い、オリゴヌクレオチド#1257-20および#1257-19をプライマーとして用いるPCRを行った。得られたPCR試料をアガロースゲル上で分離し、PCR産物を切り出し、精製し、KpnIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限消化し、精製した。T4ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPを用い、合成オリゴヌクレオチド#1257-21および#1257-22を個々にリン酸化し、次いで、一緒に混合し、94℃で加熱し、ゆっくりと室温まで冷却して、NdeIおよびKpnI粘着末端を含有するオリゴヌクレオチドリンカーデュプレックスを形成させた。NdeIおよびKpnI粘着末端(図14A参照)ならびにオリゴプライマー#1257-20および#1257-19(前記参照)を用いて生じたKpnIおよびBamHI消化の精製PCR産物を含有するオリゴヌクレオチド#1257-21および#1257-19(前記参照)を用いて生じたKpnIおよびBamHI消化の精製PCR産物を含有するオリゴヌクレオチド#1257-21および#1257-22の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを、標準的に組換えDNA法(図14Aおよび後記配列参照)を用い、プラスミドベクターの2つの部位、すなわちNdeI

部位およびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。合成リンカーはコー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。

2つのクローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、ヒトOPGインサートを引き続いて配列決定して確認した。枠内でメチオニンが直前に先行するヒトOPGポリペプチドのアミノ酸 32-401を含有する得られたpAMG21プラスミドをpAMG21-huOPGmet[32-401]またはpAMG2

1-huOPG met [32-401] という。

Oligo#1257-19

5'-TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTTATTTTTACTGATTGGAC-3'(配列番号:59)

Oligo#1257-20

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC-3' (配列番号:60)

Oligo#1257-21

5'-TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGTGATAAATGTCC GCCGGGTAC -3'(配列番号: 61)

Oliqo#1257-22

5'-CCGGCGGACATTTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTTCTTCATCCA-3'(配列番号: 47)

誘導に先立って、イー・コリGM120中のpAMG21-huOPG met [32-401] の20μg/mlカナマイシンを含有する2XYT培地中培養物を30℃でインキュベートした。1uxPRプロモーターからのhuOPG met [32-401] 遺伝子産物の誘導は、合成自己誘導剤N-(3-オキソヘキサノイル)-DL-ホモセリンラクトンを30ng/mlの最終濃度まで培養培地に添加することによって達成され、培養物をさらに6時間、30℃または37℃いずれかでインキュベートした。6時間後、この細菌培養物を封入体の存在について顕微鏡によって調べ、次いで、遠心によってペレット化した。屈折性封入体が誘導された培養中に観察され、これは、組換えhuOPG met [32-401] 遺伝子産物がイー・コリ中で不溶性にて産生されたことを示す。細菌ペレットを10mMトリスーHCI/pH8、1mM EDTAに再懸濁し、2×Laem1li試料緩衝液を1×最終まで、およびβーメルカプトエタノールを5%最終濃度まで添加することによって直接溶解させ、SDS-PAGEによって分析した。30℃および37℃で誘導された培養の全細胞溶解物であるレーン2と比較し、30℃および37℃で誘導された培養の全細胞溶解物を含有す

るSDS-PAGEで実質的により大きい強度のクーマシー染色されたほぼ42

k D a のバンドが観察された(図14B)。予期の遺伝子産物は長さが370アミノ酸で、約42.2kDaの予期の分子量を有するであろう。37℃における6時間の誘導に続き、さらなる培養をペレット化し、封入体の単離のために加工するか(後記参照)、あるいはマクロ流動化によって加工した。ミクロ流動化のために加工したベレットを25mMトリス-HC1/pH8、0.5M NaC1緩衝液に再懸濁し、Microfluidizer Model 1108(Microfluidics Corp.)を20回通し、収集した。アリコットを収集試料(ミクロ流動化した全溶解物)から取り出し、残りを20,000×gで20分間ベレット化した。遠心後に上清を取り出し(ミクロ流動化可溶性画分)、ベレットを25mMトリス-HC1/pH8、0.5M NaC1、6M尿素溶液に再懸濁した(ミクロ流動化不溶性画分)。全可溶性または不溶性画分いずれかのアリコットに等容量の2×Laem11i試料緩衝液とβ-メルカプトエタノールを5%最終濃度まで添加した。次いで、試料をSDS-PAGEによって分析した。有意量の組換えhuOPG net[32

一401]遺伝子産物が不溶性画分で見い出されたようであった。組換え蛋白質を精製するために、以下のごとくに封入体を精製した。4,900×g、4℃にて、JS-4.2ローターを装備したBeckman J-6B遠心機中、密度勾配遠心によって15分間で細菌細胞を培地から分離した。細菌ベレットを水5mlに再懸濁し、次いで、水で10mlの最終容量に希釈した。この懸濁液を、水中で冷却したステンレス鋼カップに移し、標準チップを装備したBrasonSonifierを用い、音波破壊に付した(出力セッティング=5、衝撃周波=95%、80噴出)。音波処理した細胞懸濁液を、195,000×g、23℃にて、TLA 100.3ローターを装備したBeckman Optima TLX超遠心機で5ないし10分間遠心した。上清を捨て、ベレットをスクワートボトルからの水流ですすいだ。ペレットをミクロスパチュラで掻くことによって集め、ガラス製ホモゲナイザー(15ml容量)に移した。Percol 1 溶液(75%液体Percol1、0.15M塩化ナトリウム)5mlをホモゲナイザーに添加し、内容物が均一に懸濁するまでホモゲナイズした。Perc

o 1 1 溶液の添加によって容量を 1 9 . 5 m l まで増加させ、混合

し、3つのBeckman Quick—Sealチューブ $(13\times32\,\mathrm{mm})$ に分配した。製造業者の指示に従ってチューブをシールした。23%、20,000 0 r pm  $(21,600\times g)$  にて、Beckman TLA100.3ローター中でチューブを30分間回転させた。チューブを適当なバンドパターンにつき調べた。屈折性封入体を回収するために、密度画分を回収し、プールし、次いで水で希釈した。遠心によって封入体をベレット化し、SDS—PAGEによって蛋白質濃度を見積もった。

NH<sub>2</sub>-MDEETSHQLLCDKCPPGTY-COO

H (配列番号: 62)

この配列は、細菌発現ベクターによって供されたメチオニン残基によって生じた、pAMG21 Hu-OPG met[32-401] 発現ベクターによってコードされた最初の19アミノ酸と同一であることが判明した。

### C. E F O P G met [22-401]

N-末端メチオニンおよびヒトOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクターpAMG21中の1uxPRプロモーターの制御下に置いた。pAMG21-huOPG met [32-401] (セクションB参照)の単離されたプラスミドDNAをK

pnIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断し、得られた断片をアカゲロースゲルで分離した。B断片(~1064mp断片)を標準的な方法を用いてゲルから単離した。セクションBに記載された方法を用い、合成オリゴヌクレオチド(オリゴ)#1267-06および#1267-07を個々にリン酸化し、NdeIおよびKpnI粘着末端を含有する、オリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデ

ュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、Nー末端メチオニンを供した。NdeIおよびKpnI粘着末端を含有するリン酸化オリゴリンカーおよびKpnIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで消化したpAMG21ーhuOPmet[32-401]の単離された~1064bp断片を、標準的な組換えDNA法を用い、pAMG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。製造業者のプロトコルを利用する電気泳動によって、連結混合物をイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行って、huOPG-met[22-401]遺伝子のDNA配列を確認した。

利刀°#1267-06

5'-TAT GGA AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3'(配列番号:63)

オリコ\*#1267-07

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3'(配列番号: 64)

イー・コリ宿主393中 p A M G 2 1 - h u O p H - m e t [22-401] の培養物を $20\mu$  g / m 1 カナマイシンを含有する2 X Y T 培地中に置き、誘導に先立って、30  $\mathbb C$  でインキュベートした。ベクター p A M G 2 1 の1 u x p R プロモーターからの組換え遺伝子産物発現の誘導は、合成自己誘導剤 N - (3-3) オキサヘキサノイル)- D L - ホモセリンラクトンを30 n g / m 1 の最終濃度まで培養培地に添加し、さらに6 時間、30  $\mathbb C$  g たは37  $\mathbb C$  でインキュベーショ

ンすることによって達成した。 6 時間後、細菌培養を遠心によってペレット化した(=30  $\mathbb C$  I+6 または37  $\mathbb C$  I+6)。また、この細菌培養物をインキュベーションの直前にペレット化し、あるいは別法として、自己誘導剤を別の培地に添加せず、これを30  $\mathbb C$  でさらに6 時間インキュベートして未誘導(UI)培養(30  $\mathbb C$  UI)を得た。30  $\mathbb C$  PreI、30  $\mathbb C$  UI、30  $\mathbb C$  I+6、または37  $\mathbb C$  I+6いずれかの細菌ペレットを再懸濁し、溶解させ、セクションBに記載したごとくにSDS -ポリアクリルアミド電気泳動によって分析した。ポリアクリルアミドゲルをクーマシーブルーで染色しおよび/またはニトロセルロースにウェスタン転移させ、実施例10に記載したごとくにウサギ抗

-mu OPG-Fcポリクローナル抗体で免疫プローブした。誘導後の遺伝子産物のレベルを未誘導(30 $^{\circ}$ UI)またはプレ誘導(30 $^{\circ}$  PreI)試料いずれかと比較した。

# D. ネズミOPG met [22-401]

Nー末端メチオニンおよびネズミ(mu) OPG(OPG)ポリペプチドのアミノ酸 2 2 ないし4 0 1 をコードする DNA配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクター p AMG 2 1 中の 1 u x P R プロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド# 1 2 5 7 - 1 6 および# 1 2 5 7 - 1 5 をプライマーとして、プラスミド p R c CMV - M u OPG DNAを鋳型として用い、セクションBに記載した熱サイクリング条件を用い、P C R を行った。P C R 産物を精製し、セクションBに記載したごとくに K p n I および B a m H I 制限エンドヌクレアーゼで切断した。合成オリゴ# 1 2 6 0 - 6 1 および# 1 2 6 0 - 8 2 を個々にリン酸化し、セクションBに記載した方法を用い、N d e I および K p n I 粘着末端でオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N - 末端メチオニンを供した。N d e I および K p n I 粘着末端ならびにオリゴプライ

マー#1257-16および#1257-15を用いて創製されたKpnIおよびBamHI消化され精製されたPCR産物を含有するオリゴ#1260-61

および#  $1\ 2\ 6\ 0\ -\ 8\ 2$  の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてp MAG  $2\ 1$  のNde I およびB a m H I 部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主  $3\ 9\ 3$  に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG met [ $2\ 2\ -\ 4\ 0\ 1$ ] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後におけるプラスミドpAMG21-MuOPG met [22-401]
 で保有する393細胞の培養からの組換えMuOPG met [22-401]
 ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

オリコ\* #1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA AC-3' (配列番号:65)

**がず #1257-16** 

5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG TG-3' (配列番号:66)

ty1° #1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (配列吞号: 67)

初ず #1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CCA3' (配列番号: 68)

### E. ネズミOPG met [32-401]

N-メチオニンおよびネズミ OPGのアミノ酸 32 ないし 401 をコードする DNA 配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクターpAMG21 中の 1uxPRプロモーターの制御下に置いた。これを達成するために、オリゴヌクレオチド #1267-08 および #1267-09 を個々にリン酸化し、セクションBに記載した方法を用いてオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。 合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニ

ンを供した。NdeIおよびKpnI粘着末端ならびに前記した(セクションD参照)KpnIおよびBamHI消化された精製されたPCR産物を含有するオリゴ# 1267-08および# 1267-09の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部

位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主 393 に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG met [32-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における pAMG21 組換えプラスミドを保有する 393 細胞の培養からの組換えmuOPGmet[32-401] ポリペプチドの発現をセクション C に記載した方法を用いて測定した。

オリゴ #1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (配列番号:69)

オリコ゛ #1267-09

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CTG GGT CCA-3' (配列番号:70)

## F. ネズミOPG met-lys [22-401]

N-メチオニン、続いてのネズミ OPGのアミノ酸 2 2 ないし 4 0 1 をコードする DNA 配列を、原核生物発現ベクター pAMG 2 1 中の 1 u x PR プロモーターの制御下に置いた。合成オリゴ# 1 2 8 2 - 9 5 および# 1 2 8 2 - 9 6 を個々に

リン酸化し、セクションBに記載した方法を用いてオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。NdeIおよびKpnI粘着末端ならびにセクションDに記載したKpnIおよびBamHI消化され精製されたPCR産物を含

有するオリゴ# 1281-95 および# 1282-96 の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いて p MAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG Met-Lys [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えMuOPGMet-Lys[22-401]ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

初』 #1282-95

5'-TAT GAA AGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (配列番号: 71)

**が\* #1282-96** 

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TCA-3' (配列番号: 7 2)

# G. ネズミOPG met-lys-(his), [22-401]

#1257-15を用いて生じたNdeIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG MKH [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えMuOPGMKH[22-401]ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

初』 #1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ATC ACC ATC ATG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3'(配列番号:73)

\*\*\*\* \*\*1257-15 (セクションD参照)

### H. $\lambda \vec{x} = 0 PG \text{ met} - 1 \text{ ys} [22 - 401] (his)_{7}$

Nー末端met-1ys、アミノ酸22ないし401ネズミOPG、およびアミノ酸401に続く7個のヒスチジン残基(muOPG MK[22-401]ーHァ)をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1300-49および#1300-51をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPG-met[22-401]DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、D

NA配列決定を行っ

てmuOPG MK [22-401]  $-H_7$ 遺伝子のDNA配列を確認した。 誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えmuOPG MK -[22-401]  $-H_7$ ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

初1 #1300-49

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3' (配列番号:74)

**利ゴ #1300-51** 

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGA TGT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA ACC TGA TTC CCT A-3'(配列番号:75)

### I. ネズミOPG met [27-401]

Nー末端メチオニンおよびネズミ OPGのアミノ酸 27ないし401をコードする DNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクター pAMG21中の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-74および#1257-15をプライマーとしておよびプラスミド pAM

G21-muOPG-met [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met[27-401]遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞

からの組換えmu〇PG-met [27-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

**利ご#1309-74** 

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC AT-3' (配列番号:76)

初3\*#1257-15 (See Section D)

# J. とトOPG met [27-401]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸27ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-75および#1309-76をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-huOPG-met[27-401]DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、AseIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。AseIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位

の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってhuOPGーmet「22-401]遺伝子のDNA配列を確認した。

組換えpAMG21プラスミドを保有するトランスフェクトした393細胞からの誘導後における組換えhuOPG-met[27-401]ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

オリコ": #1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT GAA GAA ACT T-3' (配列番号:77)

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT GAT T-3' (配列番号:78)

# K. ネズミOPG met [22-180]

Nー末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸22ないし180をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-72および#1309-73をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPG-met[22-401]DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製した前記PCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHIおでの間に方向付けて挿入した。連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met[22-180]遺伝子のDNA配列を確認した。

質転換393細胞からの組換えmu〇PG-met [22-180]ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形

初ゴ #1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3'(配列番号: 79)

わず #1309-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA ATT AGC A-3' (配列番号:80)

### L. ネズミOPG met [27-180]

Nー末端メチオニンおよびネズミ〇PGのアミノ酸27ないし180をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-74(セクションI参照)および#1309-73(セクションK参照)をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPGmet [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産

物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製した前記PCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG met [27-180] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞の培養からの組換えmuOPGmet[27-180]ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

M. ネズミOPG met [22-189] およびmet [22-194]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸22ないし189、または22ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。セ

クション

Bに記載した方法を用い、合成オリゴヌクレオチド# 1337-92 および# 1337-93 (=mu OPG-189 リンカー) または# 1337-93 (=mu OPG-189 リンカー) または# 1333-57 および # 1337-58 (=mu OPG-194 リンカー) の対を個々にリン酸化して、オリゴリンカーデュプレックス対を形成させた。 pAMG21-mu OPG-met[22-401] の精製プラスミドDNAをKpnI およびBspEI 制限エンドヌクレアーゼで切断し、得られたDNA断片をアガロースゲルで分離した。標準的なDNA方法を用いて $\sim413$  bp B断片を単離した。BspEI およびBamHI 粘着末端、および前記KPnI およびBspEI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミド pAMG21-mu OPG-met[22-401] の単離された $\sim413$  bp B断片を含有するオリゴ# 1337-92 おび# 1337-93 (mu OPG-189 リンカー) またはオリゴ# 1333-57 および# 1333-58 (mu OPG-194 リンカー) いずれかの間に形成されたリン酸化オリゴリンカーデュプレックスを標準的な方法を用いて pAMG21-mu OPG-met[22-401] のKPnI およびBamHI 部位の間に方向付けて挿入した。各連結混合物を製造業者のプロ

トコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主 393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met[22-189]またはmuOPG-met[22-194]遺伝子のDNA配列を確認した。

393細胞に形質転換した組換えpAMG21プラスミドからの組換えmuOPG-met[22-189] およびmuOPG-met[22-194] の発現をセクション C に記載した方法を用いて測定した。

**利ゴ #1337-92** 

5'-CCG GAA ACA GAT AAT GAG-3' (配列番号:81)

オリコ\*#1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3' (配列番号:82)

\* 初か #1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CCA CGC AAA AGT AAG-3'(配列番号:83)

*オリコ*゙ #1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3'(配列番号:84)

### N. ネズミOPG met [27-189] およびmet [27-194]

組換え p A M G 2 1 プラスミドを保有する 3 9 3 細胞の誘導後における組換え m u O P G - m e t [27-189] および m u O P G - m e t [27-194] の発現をセクション C に記載した方法を用いて測定した。

# O. E FOPG met [22-185], met [22-189], met [22-194]

Nー末端メチオニンおよびヒトOPGのアミノ酸22ないし185、22ないし189、または22ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。セクションBに記載した方法を用い、合成オリゴヌクレオチド#1331-87および#1331-88(=huOPG-185リンカー)、#1331-89および#1331-90(=huOPG-189リンカー)、または#1331-91 & #1331-91(=huOPG-194リンカー)の対を個々にリン酸化して、各々、オリゴリンカーデュプレックス対を形成させた。pAMG21-huOPG-met[27-401]の精製プラスミドDNAをKpnIおよびNdeI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、得られたDNA

断片をアガロースゲルで分離した。標準的な組換えDNA法を用いて~407bpB断片を単離した。オリゴ#1331-87および#1331-88(huのPG-185リンカー)、オリゴ#1331-89および#1331-90(huのPG-189リンカー)、またはオリゴ#1331-91および#1331-92(huのPG-194リンカー)[各リンカーはNdeIおよびBamHI粘着末端を含有する]いずれかと、前記KpnIおよびNdeI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミドpAMG-huのPG-met[27-401]の単離された~407bpB断片との間に形成させたリン酸化オリゴリンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてプラスミドpAMG21-huのPG-met[22-401]のKpnIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。各連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロボレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってhuのPG-met[22-185]、huのPG-met[22-189]、またはhuのPG-met[22-194]遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞における組換えhuOPG-met[22-185]、huOPG-met[22-189]、またはhuOPG-met[22-194]の発現をセクション Cに記載した方法を用いて測定した。

オリコ゛ #1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG-3' (配列番号:85)

初ず #1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3' (配列番号:86)

初1 #1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3' (配列番号:87)

かず #1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3' (配列番号:88)

初ず #1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC AAA AAT AAG-3' (配列番号:89)

**ポリゴ #1331-92** 

5'-GAT CCT TAT TTT TGA GTT GAT TCA CTG TTT CCG GAA CA-3' (配列番号:90)

# P. EFOPG met [27-185], met [27-189], met [27-194]

Nー末端メチオニンおよびヒトOPGポリペプチドのアミノ酸27ないし18 5、27ないし189、または27ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。各々NdeIおよびBamHI粘着末端を含有するリン酸化オリゴリンカー「huOPG-185リンカー」、「huOPH-18 9 リンカー」、または「huOPG-194リンカー」(セクション〇参照)、およびKpnIおよびNdeI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミドpAMG21-huOPG-met [27-401] の単離された~407bp B断片(セクション〇参照)を標準的な方法を用いてプラスミドpAMG21-

h u O P G - m e t [22-401] の K P n I および B a m H I 部位の間に方向付けて挿入した(セクション J 参照)。各連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主 393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミド D N A を単離し、D N A 配列決定を行って h u O P G - m e t [2]

7-185]、huOPG-met [27-189]、またはhuOPG-met [27-194] 遺伝子のDNA配列を確認した。

組換えpAMG21プラスミドからの組換えhuOPG-met [27-18]、huOPG-met [27-189]、またはhuOPG-met [27-194]の発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

Q. ネズミOPG met [27-401] (P33E、G36S、A45P)

N-末端メチオニンおよびヒトOPGのアミノ酸27ないし48、続いてネズミOPGのアミノ酸49ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21の1ux PRプロモーターの制御下に置いた。pAMG21-huOPG-met[27-401]の精製プラスミドDNA(セクションJ参照)をAatIIおよびKpnI制限エンドヌクレアーゼで切断し、標準的なDNA法を用いて、アカゲロースゲルから~1075bpB断片を単離した。さらに、プラスミドpAMG21-muOPG-met[22-401]DNA(セクションD参照)をKpnIおよびB

amHI制限エンドヌクレアーゼで消化し、前記したごとくに~1064bp B断片を単離した。AatII及びKpnI粘着末端を含有する単離された~1075bp pAMG21-huOPG-met [27-401]制限断片(前記参照)、KpnIおよびBamHI粘着末端を含有する~1064bppAMG21-muOPG-met [22-401]制限断片、およびAatIIおよびBamHI粘着末端を含有し、AatII及びBamHIの間のpAMG21の核酸配列に対応する~5043bp制限断片を標準的なDNA法を用いて連結 した。連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。標準的なDNA法を用い、クローンを選択し、プラスミド中の組換えインサートの存在を確認した。muOPG-27-401(P33E、G365、A45P)遺伝子。muOPG残基27ないし48の、huOPG残基27ないし48での置換から、プロリン-33からグルタミン酸-33への、グリシン-36からセリン-36への、およびアラニン-45からプロリン-45へのmuOPGにおけるアミノ酸変化が得られた。

組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細

胞からの組換えmu O P G - m e t [27-401] (P33E、G365、A45P) の発現をセクションC に記載した方法を用いて測定した。

R. ネズミOPG met-lys-(his),-ala-ser-(asp),4-lys [22-401] (A45T)

N-末端Hisタッグおよび(NH2からCOOH末端へ)Met-Lys-His-His-His-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Lys(=HEK)であるエントロキナーゼ認識配列、続いてネズミOPGポリペプチドのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を以下のごとくに<u>lac</u>リプレッサー調節Ps4プロモーターの制御下に置いた。pAMG22-His(セクションA参照)をNheIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで消化し、標準的なDNA法を用いて大きな断片(A断片)をアガロースゲルから単離した。先に記載した方法(セクションB参照)を用いて、オリゴヌクレオチド#1282-91および#1282-92を個々にリン酸化して、オリゴリンカーデュプレックスを形成させた。標準的なDNA法を用い、NheIおよびKpnI粘着末端を含有するオリゴ

# 1282-91 および# 1282-92 の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックス、前記したKpnI およびBamHI 消化し精製したPCR 産物(セクションD参照)、およびNheI およびBamHI で消化したベクターpA MG 22-His のA 断片を連結した。連結物を製造業者のプロトコルを利用す

るエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主GM120に形質転換した。 クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行って、mu OPG-HEK [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。DNA配列決 定により、mu OPGポリペプチドのアラニン-45のトレオニンへの単一アミ ノ酸変化が結果となる天然mu OPG配列における擬似突然変異が明らかとされ た。

合成自己誘導剤の添加の代わりに I PTGを最終 0.4 mMに添加して誘導を達成する以外は、セクション C に記載されのと同様の方法を用い、組換え p A M G 2 1 プラスミドを保有する G M 1 2 0 細胞からの組換え m u O P G - H E K [ 2 2 - 4 0 1] (A 4 5 T)の発現を測定した。

初工: #1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT GTG ATA AAT GTG CTC CGG GTA C-3' (配列番号:91)

**オリゴ #1282-92** 

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TGT CGT CGT CG-3' (配列番号:92)

# S. とトOPG met-arg-gly-ser-(his) 6 [22-4]

8つのオリゴヌクレオチド(後記で示す1338-09ないし1338-16)を設計して、重複する二本鎖DNAとして175塩基の断片を得た。オリゴをアニールし、連結し、5'および3'オリゴをPCRプライマーとして用いて、大量の175塩基断片を得た。最終PCR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼで消化して断片が得られ、これはヒトOPGのN-末端28コドンが置き換えられている。C1aIおよびKpnI消化のPCR産物を、やはりC1aIおよびKpnIで切断されているpAMG21-huOPG[27-401]に挿入した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を

保有する能力につきクロー

ンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50m1の振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEおよびウェスタン分析によって、構築体の発現につき分析した。その結果大きな封入体および蛋白質が形成されるhuOPGMet-Arg-Gly-Ser-(His)6 [22-401] の発現を不溶性(ペレット)画分に突き止めた。

1338-09

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA (配列番号:93)

1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT CGC ATC AC (配列番号:94)

1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC GAC GAA GA (配列番号:95)

1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC CCA AAC A (配列番号:96)

1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT (配列番号: 9 7)

1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT CGT AGT GCA GGT ATT TCG GC (配列番号:98)

1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA TTT TAT T (配列番号:99)

1338-16

CCT CCI TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT GTG TTT GT (配列番号:100)

# T. とトOPG met-lys [22-401] およびmet (lys)<sub>3</sub> [22-401]

ヒトOPG [22-401] のmet-lysおよびmet-(lys) $_3$ バージョンを構築するために、重複するオリゴヌクレオチドを設計して、適当な数のリシン残基を付加した。各構築体につき2つのオリゴを設計して、重複させ、最終産物を得るための2ラウンドのPCRが可能となった。第1のPCR反応についての鋳型はヒトOPG22-401遺伝子を含有するプラスミドDNA調製であった。第1のPCRはリシン残基を付加した。第2のPCRは第1ラウンドの生成物を使用し、第1の制限部位ClaIに配列を逆付加した。

最終CR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼClaIおよびKpnIで消化し、これはhu OPGのN-末端の28コ

ドンを置き換た。次いで、やはり2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるプラスミドpAMG21-hu OPG [27-401] に連結した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクローンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mlの振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、ネズミ抗ーOPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEおよびウェスタン分析によって、構築体の発現につき分析した。いずれの構築体も蛋白質発現の検出可能なレベルを有さず、封入体は見えなかった。DNA配列はDNA配列決定法によって確認した。

Met-Lys huOPG [22-401] を調製するためのオリゴヌクレオチドプライマー

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TG (配列番号:101)

1338-18

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAG AAA CTT TTC CTC CAA AAT ATC (配列番号: 102)

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (配列番号: 103)

Met·(Lys)3 huOPG [22-401] を調製するためのオリゴスクレオチドプライマー

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TG (配列番号: $1\ 0\ 4$ )

1338-19

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (配列番号: 106)

### U. ヒトおよびネズミOPG [22-401] / Fc融合

ヒトIgG1のF c 領域をヒトもしくはネズミいずれかのオステオプロテゲリンアミノ酸 2 2 ないし 4 0 1 のNー末端において(F c / O P G [ 2 2 - 4 0 1 ] という)、またはC - 末端において(O P G [ 2 2 - 4 0 1 ] / F c という)融合して、4 つの O P G - F c 融合を構築した。F c 融合は実施例 7 に記載した融合ベクター p F c - A 3 を用いて構築した。

全ての融合遺伝子は、標準的なPCR技術を用いて構築した。PCR反応用の 鋳型は標的遺伝子を含有するプラスミドであった。重複するオリゴを設計して、 1の遺伝子のC-末端部分と 他の遺伝子のNー末端部分を合わせた。このプロセスにより、適当なPCR反応が行われた後に、2つの遺伝子が一緒になって正しい読枠にて融合される。最初に、各遺伝子についての1つの「融合」オリゴを、標的遺伝子を担うベクター用にユニバーサルプライマーを用いるPCR反応に付した。相補的「融合」オリゴを他の遺伝子をPCRに付すためのユニバーサルプライマーと共に用いた。この第1のPCR反応の終わりに、2つの別々の産物が得られ、各個々の遺伝子は存在する融合部位を有し、PCRの第2ラウンドを駆動し、所望の融合を生じるのに十分な重複を得た。PCRの第2ラウンドにおいて、第1の2つのPCR産物を、ユニバーサルプライマーと共に、重複領域を介して合わせ、全長融合DNA配列が生成した。

最終PCR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼXbaIおよびBamHIで消化し、次いで、やはり2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるベクターpAMG21に連結した。連結されたDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクローンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mlの振盪フ

ラスコ実験により測定した。全細胞溶解物、音波処理ペレット、および上清を、ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタン分析によって、融合の発現につき分析した。

# Fc/huOPG [22-401]

1318-48

CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TT (配列番号:107)

1318-49

CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG CGT GT (配列番号: 108)

### Fc/muOPG[22-401]

融合ペプチドの発現はクーマシー染色ケルおよびウェスタンブロットで検出された。細胞は非常に大きな封入体を有し、大

部分の産物は不溶性(ペレット)画分にある。以下のプライマーを用いてこのOPG-Fc融合を構築した。

1318-50

CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT ACC TGC (配列番号: 109)

1318-51

CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT (配列番号: 1 1 0)

### muOPG[22-401/Fc]

融合ペプチドの発現はクーマシー染色ゲルおよびウェスタンブロットで検出された。組換え産物の量は、Nー末端位にFc領域を有するOPG融合蛋白質よりも少なかった。明らかな封入体は検出されなかった。産物のほとんどは不溶性(ペレット)画分にあるようであった。以下のプライマーを用いてOPG-Fc融合を構築した。

1318-54

GAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC (配列番号:111)

1318-55

### h u O P G [22-401] /F c

融合蛋白質の発現はクーマシー染色ゲルでは検出されなにかったが、かすかなウェスタン陽性シグナルが存在した。明らかな封入体は検出されなかった。以下のプライマーを用いてこのOPG-Fc融合を調製した。

1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC (配列番号: 113)

1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG (配列番号:114)

## V. ヒトOPG met [22-401] - Fc融合 (P25A)

本構築体は、25位におけるプロリンからアラニンへのアミノ酸変化(P25A)をhuOPG met[22-401] -Fc 融合と組み合わせたものである。プラスミドを、当該遺伝子のN - 末端の28 コドンを除去する制限エンドヌクレアーゼC1 a I およびKp n I で消化し、得られた小さな(200 塩基対未満)断片をゲル精製した。次いで、プロリンからアラ

ニンへの変化を含むこの断片を、該2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるプラスミドpAMG21-huOPG[22-401]-Fc融合に連結した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクローンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mlの振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、

ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタン分析によって、融合の発現につき分析した。融合蛋白質の発現レベルがクーマシー 染色PAGEゲルおよびウェスタンブロットで検出された。蛋白質は不溶性(ペレット)画分にあった。細胞は大きな封入体を有していた。

### W. $\[ \] \]$ Met [22-401] (P25A)

原核生物発現ベクター pAMG 21 中の1ux  $P_R$ プロモーターの制御下にある、N-末端メチオニンおよび 25 位のプロリンがアラニンによって置換されたヒト〇 PGのアミノ酸 22 ないし 401 をコードする DNA配列を以下のごとくに構築した。合成オリゴ# 1289-84 および 1289-85 をア

ニールして、X b a I および K p n I 粘着末端を持つオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスは最適なイー・コリのコドンを利用し、N - 末端メチオニンをコードする。また、該リンカーは元の配列には存在していなかった S p e I 制限部位を含んでいた。標準的な方法を用い、該リンカーデュプレックスを p A M G 2 1 - h u O P G - 2 2 - 4 0 1 における X b a I および K p n I 部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を形質転換によってイー・コリ宿主 G M 2 2 1 に導入した。クローンをまず組換え蛋白質の産生につきスクリーニングした。プラスミド D N A を陽性クローンから単離し、D N A 配列決定を行って、H u O P G - M e t [22-401] (P 25A) 遺伝子の D N A 配列を確認した。以下のオリゴヌクレオチドを用いて X b a I - K p n I リンカーを生成させた。

初年 #1289-84

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC -3' (配列番号:115)

初』 #1289-85

5'- CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC TAG TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG CAA AAG TTT CCA TAT GTT ATT CCT CCT T-3' (配列番号:  $1\ 1\ 6$ )

# X. ヒトOPG met [22-401] (P26A) および (P26D)

クローンをまず組換え蛋白質の産生につきスクリーニングした。プラスミドDNAを陽性クローンから単離し、DNA配列決定を行って、huOPG-met [22-401] (P26A)遺伝子のDNA配列を確認した。配列決定したクローンのうちの1つは、26位のプロリンがアラニンではなくむしろアスパラギン酸によって置換されていることが判明し、このクローンをhuOPG-met [22-401] (P26D)と命名した。以下のオリゴヌクレオチドを用いてX bal-Spellリンカーを生成させた。

初年 #1289-86

5' - CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC TGC TAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA - 3'(配列番号:117)

初工 #1289-87

5' - CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA GGA AAA GTT TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT - 3'
(配列番号: 1 1 8)

# Y. E F O P G met [22-194] (P25A)

原核生物発現ベクターpAMG21中のlux Prプロモーターの制御下に

ある、N-末端メチオニンおよび25位のプ

ロリンがアラニンによって置換されたヒトOPGのアミノ酸 2 2 ないし 1 9 4 に つきコードする DNA配列を以下のごとくに構築した。プラスミド p AMG 2 1 ー p u O P G [2 7 - 1 9 4] および p AMG 2 1 ー p u O P G [2 2 - 4 0 1] [2 2 - 4 0 1] [2 2 - 4 0 1] [2 2 - 4 0 1] から p が p AMG p AM

実施例 9

OPGモノマーの会合

muOPG [22-401] を過剰発現するように設計されたCHO細胞を用いて、ウサギ抗-OPGポリクローニル抗体を用い、分泌された組換えOPGの分析用の馴化培地を得た。馴化培地のアリコットを20-倍濃縮し、次いで、還元性およ

び非還元性SDS-PAGEによって分析した(図15)。還元性条件下では、蛋白質は、成熟蛋白質がその1以上のコンセンサスN-結合糖鎖付加部位において糖鎖付加されているであろう予測されるがごとくに、Mr50-55kdポリペプチドとして移動した。驚くべきことに、同試料を非還元性SDS-PAGEによって分析すると、大部分の蛋白質はほぼ100kdポリペプチド(還元された蛋白質のサイズの2倍)として移動した。加えて、少量のMr50-55kdポリペプチドがあった。SDS-PAGEでの移動のこのパターンは、OPG産物は遊離スルフヒドリル基の酸化を介してダイマーを形成しているという認識と合致した。

予測された成熟OPGポリペプチドは23個のシステイン残基を含み、そのう

ち18個が、4つのシステインーリッチのドメインよりなる鎖内ジスルフィド架橋の形成に関与すると予測された(図12A)。5つの残りのCー末端システイン残基は、他のTNRFファミリーメンバーとの相同性に基づいて予測できる第2次構造に関与しない。総じて、正味の一様でない数のシステイン残基があり、形式的には、少なくとも1つの残基は遊離していて、2つのOPGモノマーの間で分子間ジスルフィ

ド結合を形成する可能性がある。

OPG動性およびモノマー会合のパターンの解明を助けるために、パルスー追跡標識実験を行った。 $^{35}$  S メチオニンおよびシステインを含有する無血清培地中、mu O P G [22-401] を発現する C H O 細胞を前記したことく 30 分間代謝的に標識した。この時間の後、培地を取り出し、未標識メチオニンおよびシステインを放射性アミノ酸の元の濃度に対してほぼ2,000-倍過剰のレベルにて含有する完全培地で取り替えた。添加後 30 分、1時間、2時間、4時間、6時間および12時間において、馴化培地を取り出して培養物を収穫し、馴化培地の溶解物および接着性単層を調製した。培地および細胞溶解物を前記したごとくに清澄化し、次いで、前記したごとくに抗一〇PG抗体を用いて免疫沈降させた。免疫沈降物を洗浄した後、非還元性 S D S - P A G E 緩衝液中で沸騰させることによってそれらを遊離させ、次いで2つの等しい半分物に分けた。1つの半分物に還元剤  $\beta$  - メルカプトエタノールを5%(v V V ) 最終濃度まで添加し、他方、他の半分物を非還元性条件に維持した。両セットの免疫沈降物を前記したごとくにS D S - P A G E によって分析し、次いで、オートラジオグラフィー用

に加工し、フィルムに暴露した。結果を図16に示す。還元性SDS-PAGEによって分析した試料を底部の2つのパネルに示す。合成の後、OPGポリペプチドをわずかにより大きいポリペプチド(これは、恐らくはN-結合糖鎖付加による修飾を表す)へと迅速に加工処理された。ほぼ1-2時間後、細胞中のOPGのレベルは劇的に低下し、同時に培養上清に出現する。これは経時的な細胞から培地へのOPGの定方向的輸送の結果であると考えられ、OPGが天然では分

泌蛋白質であるという認識と合致する。非還元条件下での同免疫沈降物の分析により、OPGダイマーの形成と馴化培地への分泌との間の関係がわかる(図16、上方パネル)。最初の30-60分において、OPGモノマーは、明らかな糖鎖付加によって細胞中で加工され、続いてダイマーが形成される。時間が経つと、大量のOPGモノマーがダイマーへと誘導され、これは引き続いて細胞から消失する。合成後約60分から始まり、OPGダイマーが馴化培地に出現し、実験の継続中にわたって蓄積する。この時期の後、OPGダイマーが形成され、これは次いで培養培地中に分泌される。全経過でOPGモノマーは細胞内で低レベルのままでおり、また、少量が培地中に出現する。これは共有結

合OPGの分解の結果のようには見えず、むしろ、細胞中での化学量的の量のモ ノマーの産生および引き続いての分泌の結果のようである。

トランスフェクトされたCHO細胞から組換えにより産生されたOPGは圧倒的にダイマーのようである。二量体化がOPG合成における天然のプロセスであるか否かを判断するために、本発明者らは、天然でOPGを発現することが見い出されている細胞系の馴化培地を分析した。CTLL-2細胞、ネズミ細胞傷害性Tリンパ球細胞系(ATCC受託番号TIB-214)は組織および細胞系RNAのスクリーニングにおいてOPG mRNAを発現することが判明した。OPG転写体は腎臓から同定されたクローン化され配列決定された2.5-3.0kb RNAと同一であることが判明し、また、分泌される分子をコードすることが判明した。CTLL-2細胞から得られた馴化培地のウェスタンブロット分析は、全てではないにせよ、分析されたOPG蛋白質のほとんどはダイマーであることを示す(図17)。これはOPGの二量体化および分泌が細胞系における過剰発現の人工的なものではなく、発現細胞によってそれが産生されるごとく、産物の主要な形態であるらしいことを

#### 示唆する。

正常およびトランスジェニックマウスの組織および血清を分析して、OPGトランスジェニックマウスで発現されたOPG分子の性質を決定した。ラットOP

G cDNAは肝細胞制御エレメントの制御下で発現されたので、非還元性条件下で対照およびトランスジェニックマウスの異常発育組織から作成された抽出物を分析した(図18)。対照マウスからではなくトランスジェニックマウスからの抽出物において、化学量論的量のモノマーと共にOPGダイマーが容易に検出される。OPGダイマーおよびモノマーは遺伝子工学により作成されたCHO細胞で発現された組換えネズミ蛋白質と同一のようである。これは、OPGダイマーが、事実、遺伝子産物の天然形態であって、鍵となる活性成分であることを強く示唆する。対照およびトランスジェニックマウスから得られた血清試料を同様にウェスタンブロット分析によって分析した。対照マウスにおいて、大部分のOPG蛋白質はダイマーとして移動し、他方、少量のモノマーも検出される。加えて、有意量のより大きいOPG関連蛋白質が検出され、これは共有結合トリマーの予測されるサイズと一致する相対的分子量にて移動する。かくして、組換えOP

GはOPGトランスジェニックマウスにおいて、圧倒的にダイマー蛋白質として発現され、ダイマー形態はOPGマウスにおける大理石骨病表現型に対する基礎となるであろう。また、OPG組換え蛋白質はより高分子量の「トリマー」形態でも存在し得る。

OPGの5つのCー末端システイン残基がホモダイマー化において役割を演じるか否かを判断するために、前記したQiockChange™部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene, San Diego, CA)を用い、システイン残基195(C195)、C202、C277、C319、およびC400に対するネズミOPGコドンをセリンに変化させた。muOPG遺伝子をpcDNA3.1(+)ベクター(Invitrogen, San Diego, CA)のNotIおよびXbaI部位の間にサブクローンした。得られたプラスミド、pcDNA3.1ーmuOPG、および突然変異原性プライマーをデオキシヌクレオチドの存在下でPfuポリメラーゼで処理し、次いで、前記したごとくサーモサクラーで増幅した。次いで、反応のアリコットを熱ショックによってコンピテント・イー・コリXL1-Blueにトランスフェク

トし、次いて、平板培養した。次いで、トランスフェクタントからのプラスミド DNAを配列決定して突然変異を確認した。

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンをシステイン残基 195からセリンに変化させ、その結果、muOPG[22-401]C195 S蛋白質が産生した。

1389-19:

5' -CAC GCA AAA GTC GGG AAT AGA TGT CAC-3'(配列番号:150)

1406-38:

5' -GTG ACA TCT ATT CCC GAC TTT TGC GTG-3'(配列番号: 151)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンをシステイン残基202からセリンに変化させ、muOPG[22-401]C202S蛋白質が産生した。

1389-21:

5' -CAC CCT GTC GGA AGA GGC CTT CTT C-3'(配列番号: 152)

1389-22:

5' -GAA GAA GGC CTC TTC CGA CAG GGT G-3' (1389-22) (配列番号: 153)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンをシステイン残基 277からセリンに変化させ、muOPG[22-401]C277S蛋白質が 産生した。

1389-23:

5' -TGA CCT CTC GGA AAG CAG CGT GCA-3'(配列番号:154)

1389-24:

5' -TGC ACG CTG CTT TCC GAG AGG TCA-3'

(配列番号:155)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンをシステイン残基 319からセリンに変化させ、muOPG [22-401] C319S蛋白質が 産生した。

1389-17:

5' -CCT CGA AAT CGA GCG AGC AGC TCC-3'(配列番号:156)

1389-18:

5' -CGA TTT CGA GGT CTT TCT CGT TCT C-3'(配列番号:157)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンをシステイン残基400からセリンに変化させ、muOPG[2

2-401] C400S蛋白質が産生した。

1406-72:

5' -CCG TGA AAA TAA GCT CGT TAT AAC TAG GAA TGG-3'(配列番号:158)

1406-75:

5' -CCA TTC CTA GTT ATA ACG AGC TTA TTT TCA CGG-3'(配列番号:159)

次いで、適当な突然変異を含有する各得られたmuOPG [22-401] プラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、突然変異体OPG-Fc融合蛋白質を前記したごとくに馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したごとくにイン・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。各トランスフェクントからの馴化培地を非還元性SDS-PAGEおよび抗-OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって分析した。

5つのC-末端システイン残基のいずれの突然変異も、その結果、圧倒的な (>90%) モノマー55kdOPG分子の産生となった。これは、C-末端システイン残基が一緒になってOPGホモダイマー化で役割を演じていることを強く示唆する。

OPGホモダイマー化に重要なOPG Cー末端ドメインの領域をマップするために、Cー末端OPG欠失突然変異体を構築した。これらのOPG突然変異体は、末成熟停止翻訳シグナルをネズミOPGのCー末端領域に導入するプライマーを用い、PCR増幅によって構築した。5'オリゴはMuOPG開始コドン(HindIII制限部位)に対して設計し、3'オリゴヌクレオチド(停止コドンおよびXhoI部位を含有)は、トレオニン残基200(CT200)、プロリン212(CT212)、グルタミン酸293(CT−209)、またはセリン355(CT−355)いずれかにおいて終わるmuOPGのCー末端領域切形(trancate)となるように設計した。

以下のプライマーを用いて、muOPGi[22-200]を構築した。 1091-39:

 $5^{\prime}$  -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3  $^{\prime}$  (配列番号: 1 6 0)

1391-91:

5' -CCT CTC TCG AGT CAG GTG ACA TCT ATT CCA CAC TTT TGC GTG GC-3' (1391-91) (配列番号: 1 6 1)

以下のプライマーを用いて、muOPG[22-212]を

#### 構築した。

1091-39:

 $5^\prime$  -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3  $^\prime$  (配列番号:1 6 2 )

1391-90:

5' -CCT CTC TCG AGT CAA GGA ACA GCA AAC CTG AAG AAG GC -3' (配列番号: 1 6 3)

以下のプライマーを用いて、muOPG[22-293]を構築した。

1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3' (配列番号: 164)
1391-89:

5'- CCT CTC TCG AGT CAC TCT GTG GTG AGG TTC GAG TGG CC-3' (配列番号: 165)

以下のプライマーを用いて、muOPG[22-355]を構築した。 1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA AG-3' (配列番号: 1 6 6)

1391-88:

5' CCT CTC TCG AGT CAG GAT GTT TTC AAG TGC TTG AGG GC-3' (配列番号:167)

次いで、適切な切形を含有する各得られたmu OPG-CTプラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、突然変異体OPG-Fc融合蛋白質を前記したごとくに馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したイン・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。また、非還元性SDS-PAGEおよび抗-OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって馴化培地を分析した。

OPGのC-末端領域の切形 (trancation) はホモダイマーを形成するOPG の能力に影響する。CT355は圧倒的にモノマーであるが、いくらかのダイマーが形成される。CT293は等モル量のモノマーおよびダイマーであるように見えるものを形成し、また、高分子量が集合する。しかしながら、CT212およびCT200はモノマーである。

実施例10

OPGの精製

A. 哺乳動物OPG-Fc融合蛋白質の精製

OPG-Fc融合蛋白質を発現する293細胞からの馴化培地5Lを以下のごとくに調製した。細胞の凍結試料を10mlの293S培地(DMEM-高グル

#### コース、1×L-グルタミ

ン、10%加熱不活化胎児ウシ血清(FAB)および $100\mu$ g/mlセグロマイシン)に解凍し、1日後に新鮮な培地を供給した。3日後、細胞を1:10および1:20希釈にて、2つのT175フラスコに分けた。2つのさらなる1:10分割を行って、200のT175フラスコにスケールアップした。細胞はこの時点で解凍の5日後であった。細胞をほとんど密集まで増殖させ(約3日)、その時点で血清含有培地を吸引し、細胞をフラスコ当たり25mlのPBSで1回洗浄し、25mlのSF培地(DMEM-高グルコース、 $1\times$ L-グルタミン)を各フラスコに添加した。細胞を3日間、5%CO2中に維持し、その時点で培地を収穫し、遠心し、0.25m硝酸セルロースフィルター(Corning)を通して濾過した。

PBS中で平衡化させたプロテインG Sepharoseカラム(Pharmacia)を用い、OPG-Fc融合蛋白質を精製した。カラムサイズは出発培地の容量に応じて変化させた。前記したごとくに調製した馴化培地を該カラムに負荷し、カラムをPBSで洗浄し、 $100 \, \text{mM}$ グリシン、 $pH2.7 \, \text{を}$ 用いて純粋な蛋白質を溶出させた。1Mトリス $pH9.2 \, \text{を}$ 含有する試験管に画分を収集して、出来る限り素早く中和した。

蛋白質含有画分をプールし、Amicon CentriconまたはCentriprep10いずれかで濃縮し、PBSに透析濾過した。純粋な蛋白質を-80℃で保存した。

ネズミ [22-401] -Fc、ネズミ [22-180] -Fc、ネズミ [22-194] -Fc、ヒト [22-401] -Fcおよびヒト [22-201] -Fcをこの手法によって精製した。ネズミ [22-185] -Fcはこの手法によって精製される。

### B. 抗-OPG抗体の調製

3 匹のNew Zealand Whiteウサギ(初期体重5-8 lbs)にmuOPG [22-401] - Fc融合蛋白質を皮下注射した。等容量のフ

ロイントの完全アジュバント中に乳化した  $50\mu$  抗原で各ウサギを第1日に免疫化した。フロイントの不完全アジュバントで置き換えて、同一手法によって、さらにブースト(第14日および 28日)注射を行った。抗体の力価をEIAによってモニターした。第2ブーストの後、抗血清は高抗体力価を示し、25m1の生じた血液を各動物から得た。該血清を、まず、ネズミOPG-Fc6固定化したアフィニティーカラムに通した。抗OPG抗体を、1%水酢酸

を含有するPierce温和溶出緩衝液(Gentle Elution Buffer)で溶出させた。次いで、溶出した蛋白質をPBSに透析し、Fcカラムに通して、<math>OPG融合蛋白質のFc部分に対して特異的ないずれの抗体も除去した。抗-OPG特異的抗体を含有する画分を通じての実験物をPBSに透析した。

# C. ネズミOPG [22-401] の精製

抗体アフィニティークロマトグラフィー

アフィニティー精製した抗一〇PG抗体をカップリング緩衝液(0.1M炭酸ナトリウム、pH8.3、0.5M NaC1)に透析濾過し、室温にて2時間、CNBrー活性化セフアロースビーズ(Pharmacia)と混合した。次いで、1Mエタノールアミン(pH8.0)で未カップリング部位をブロックする前に、室温にて樹脂をカップリング緩衝液で十分に2時間洗浄した。次いで、樹脂を低pH(0.1M酢酸ナトリウム、pH4.0、0.5M NaC1)、続いて高pH洗液(0.1M トリスーHC1、pH8.0)0.5M NaC1)、続いて高pH洗液(0.1M トリスーHC1、pH8.0)0.5M NaC1)で洗浄した。最後の洗浄を3回反復した。カラムに充填する前に、樹脂を最後にPBSで平衡化させた。充填後一度、樹

脂をPBSで洗浄した。0.1M グリシン-HCI (pH2.5) でブランク 溶出を行い、続いてPBSで再平衡化させた。

muOPG[22-410]を発現するCHO細胞からの濃縮された馴化培地を低液速でカラムに適用した。280nmで測定したUV吸収がベースラインに復帰するまでカラムをPBSで洗浄した。蛋白質をまず0.1Mグリシン-HC

1 (pH2.5)でカラムから溶出させ、PBSで再平衡化させ、第2緩衝液(0.1M CAPS、pH10.5、1M NaCl)で溶出させた。2回の溶出プールを別々にPBSに透析濾過し、-20℃で凍結する前に滅菌濾過した。

#### 通常のクロマトグラフィー

CHO細胞馴化培地をAmiconラセン巻カートリッジ(S10Y10)にて23×に濃縮し、20mMトリスpH8.0に透析濾過した。次いで、透析濾過した培地を、20mMトリスpH8.0で平衡化してあるQーセファロースH(Pharmacia)カラムに適用した。次いで、カラムを280nmにおける吸収がベースラインに到達するまで洗浄した。蛋白質を20カラム容量のトリスpH8.0中の0-300mMNaC1グラジエントで溶出させた。カラム画分のウェスタン

ブロットを用いてOPG蛋白質を検出した。

OPGを含有する画分をプールし、300mM NaC1、0.2mM DT Tの最終濃度に持って行った。NiNTAスーパーローズ(Qiagen)カラムを20mMトリスpH8.0、300mM NaC1、0.2mM DTTで平衡化させ、しかる後、プールして画分を適用した。ベースライン吸収に到達するまで、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。平衡化緩衝液中の0-30mMイミダゾールグラジエントで蛋白質をカラムから溶出させた。残存する蛋白質を1Mイミダゾールでカラムから洗い出した。再度、ウェスタンブロットを用いてOP G含有画分を検出した。

NiNTAカラムからのプールした画分を $10\,\mathrm{mm}$  リン酸カリウム  $\mathrm{p}\,\mathrm{H}\,7$ . 0、0.  $2\,\mathrm{m}\,\mathrm{M}$  DTTに透析した。次いで、透析したプールを、 $10\,\mathrm{m}\,\mathrm{M}$ リン酸緩衝液で平衡化させてあるセラミックヒドロキシアパタイトカラム(Bio-Rad)に適用した。カラム洗浄の後、 $20\,\mathrm{n}$ カラム容量にわたって $10-100\,\mathrm{m}\,\mathrm{M}$ リン酸カリウムグラジエントで蛋白質を溶出させた。これに続いて、 $20\,\mathrm{n}$ ラム容量の $100-400\,\mathrm{m}\,\mathrm{M}$ リン酸塩のグラジエントを行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲルのクーマシーブルー染色によっておよびウエ

スタンブロッティングによってOPGを検出した。画分をプールし、PBSに透析濾過し、-80℃で凍結させた。精製した蛋白質はモノマーとして泳動し、PBSへの透析濾過後でもそのままであろう。モノマーは4℃でpH5にて凍結保存した場合にも安定である。しかしながら、もしPBS中、4℃で保存すると、ダイマーならびにトリマーおよびテトラマーであるらしいものが1週間後に形成されるであろう。

#### D. イー・コリからのヒトOPG met [22-401] の精製

5の溶液(最終濃度)によって15%(w/v)まで30分間で可溶化した。この溶液を、50mM CAPS、pH10.5、1mM還元型グルタチオンを含有する2M尿素に30倍希釈し、次いで、5℃で72時間撹拌した。まず酢酸でpH4.5に調整し、次いで25mM酢酸ナトリウム、pH4.5で平衡化させたSP-HPSepharosed間間のカラムでのクロマトグラフィーに付すことによってOPGを25℃でこの溶液から精製した。カラム溶出は、0.1カラム容量/分の液速にて20カラム容量を用い、同緩衝液中50mMないし550mMの塩化ナトリウムの直線グラジエントで行った。所望のOPG形態のみを含有するピーク画分をプールし、5℃で保存するか、あるいは緩衝液をリン酸緩衝化生理食塩水に交換し、限外濾過によって濃縮し、次いで5℃で保存した。この物質を、逆相HPLC、SDS-PAGE、エンドトキシンの存在についてのカブトガニ遊走細胞溶解物アッセイ、およびN-末端配列決定によって分析した。加えて、質量分析、pH/温度安定性、蛍光、円二色性、示差走査熱分析、およ

びプロテアーゼプロフィリングアッセイのごとき技術を用いて蛋白質の折り畳まれた特性を調べることもできる。

#### 実施例11

組換えOPGの生物学的活性

組織学および組織形態学に基づくと、トランスジェニックマウスにおける〇PGの肝臓での過剰発現は破骨細胞の数を顕著に減少させ、骨組織の顕著な増加に至るようであった(実施例4参照)。このイン・ビボ効果の基礎となる可能なメカニズムへのさらなる洞察を得るために、種々の形態の組換え〇PGを、破骨細胞形成のイン・ビトロ培養モデル(破骨細胞形成アッセイ)でテストした。この培養系は元々Udagawa(Usagawaら,Endocrinology125,1805−1813(1989),Proc.Nat1.Acad.Sci.USA 87,7260-7264(1990))によって考案されたもので、骨髄細胞および骨髄支質細胞系からの細胞の組合せを使用する。これらの実験で使用した培養系の修飾の記載は従前に公開されている(Laceyら,Endocrinology 136,2367-2376(1995))。この方法においては、マウスからの大腿骨および脛骨から満たした骨髄細胞を、500 リノm1 CSF-1(コロニー刺激因子1、M-CSFとも呼ばれる)、単球/マクロファージフ

ァミリー系統の細胞に対して特異的な造血成長因子を補足した、培養培地(10%の加熱不活化胎児ウシ血清を含むアルファMEM)中で一晩培養する。このインキュベーションに続き、非接着性細胞を収集し、グラジエント精製に付し、次いで、骨髄細胞系ST2からの細胞と共培養する(1×10 $^6$  非接着性細胞:1×10 $^5$  ST2細胞/m1培地)。デキサメタゾン(100 n M)および1,25 ジヒドロキシビタミンD3としても知られているビタミンD3の生物学的に活性な代謝産物(1,25 (〇 H)  $_2$  D 3,10 n M)を培地に補足する。破骨細胞の出現を増強するために、プロスタグランジンE2(250 n M)をいくつかの培養に添加する。共培養期間は通常8-10日の範囲であり、新たに添加した

全ての補足物と共に培地を 3-4 日毎に新しくする。種々の間隔で、組織化学染色(Sigma キット番号 3 8 7 A , Sigma , St . Louis , MO) またはTRAP溶液アッセイいずれかを用い、培養を、酒石酸酸性ホスファターゼ(TRAP)の存在につき評価する。このTRAP組織化学方法により、TRAP +であり多核化された( $\ge 3$  核)細胞である破骨細胞の表現型を同定できる。溶液アッセイは、0 . 1 %トリトンX-1 0 0 を含有する

クエン酸緩衝液(100mM、pH5.0)中で破骨細胞含有培養物を溶解することを含む。次いで、室温で3-5分間のインキュベーションの間に起こる、80mM酒石酸ナトリウムの存在下におけるp-ニトロフェニルホスフェート(20nM)からp-ニトロフェノールへの変換に基づいて、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性を測定する。0.5Mの最終濃度までNaOHを添加することによって反応を終了させる。405nmにおける光学密度を測定し、結果をプロットする。

破骨細胞形成アッセイを用いる従前の研究(Udagawaら,前掲)は、これらの細胞は、 $^{125}$  I - カルシトニン(オートラジオグラフィー)に対する受容体を発現し、骨表面に小窩を作ることができ、これをTRAP陽性性と組み合わせると、多核化細胞は破骨細胞表現型を有することが確認されることを、示している。破骨細胞形成アッセイにおいてイン・ビトロで生起する多核化細胞の破骨細胞表現型を支持するさらなる証拠は、免疫組織化学法により $\alpha$  v および $\beta$  3 インテグリンをならびにイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション(ISH)によりカルシトニン受容体およびTRAP mRNAを発現するということである。

huOPG [22-401] -Fc融合をCHO細胞馴化培地から精製し、引き続いて破骨細胞形成アッセイに用いた。huOPG [22-401] -Fcの100ng/mlで、破骨細胞形成は実質的に100%阻害された(図19A)。マイクロタイタープレートウェル中の溶解した培養物で測定されたTRAPのレベルもOPGの存在下で阻害され、IDsoはほぼ3ng/mlであった(図20)。溶解物におけるTRAP活性のレベルはTRAP細胞化学法によって観察

された破骨細胞の相対数と相関しているようであった(図19A-19Gおよび 20 を比較されたし)。また、精製されたヒト1gG1およびTNFbpは、このモデルでテストしたところ、阻害もしくは刺激効果を有しないことが判明し、 huOPG[22-401]-Fcの阻害効果は融合蛋白質のOPG部分によるものであることが示唆された。さらなる形態のヒトおよびネズミ分子をテストし、蓄積されたデータを表1にまとめる。

表 1

イン・ビトロ破骨細胞形成に対する種々のOPG形態の効果

O P G 構 築 体	イン・ビトロにおける相対的生物活性
muOPG[22-401]-Fc	+++
muOPG[22-194]-Fc	+++
muOPG[22-185]-Fc	+ +
muOPG[22-180]-Fc	-
mu O P G [ 2 2 - 4 0 1 ]	+++
mu O P G [ 22 - 401 ] C 195	+++
m u O P G [ 2 2 - 4 0 1 ] C 2 0 2	+
mu O P G [ 22 - 401 ] C 277	-
mu0PG[22-401]C319	+
mu O P G [ 2 2 - 4 0 1 ] C 4 0 0	+
mu OPG [22-185]	-
mu O P G [ 2 2 - 1 9 4 ]	++
mu OPG [ 22 - 200 ]	++
mu OPG [22-212]	-
mu O P G [ 2 2 - 2 9 3 ]	+++
mu OPG [22-355]	+ + +
hu0PG[22-401]-Fc	+++
hu0PG[22-201]-Fc	+++
hu0PG[22-401]-Fc P26A	+ + +
hu0PG[22-401]-Fc Y28F	+++
hu0PG[22-401]	+++
hu0PG[27-401]-Fc	++
hu0PG[29-401]-Fc	++
hu0PG[32-401]-Fc	+/-
+++,ED <sub>50</sub> =0.4-2 ng/ml	
++, ED <sub>50</sub> = 2-10 ng/ml	
+, $ED_{50} = 10 - 100 \text{ ng/ml}$	
-, ED <sub>50</sub> > 100 ng/ml	
, np)(/, roo n2/m1	

蓄積されたデータは、Fcドメインに融合させた場合または融合させなかった場合、ネズミおよびヒトOPGアミノ酸配列 22-401はイン・ビトロで十分活性であることを示す。それらは用量依存的に阻害し、2-10ng/m1範囲

の半最大活性を保有する。トレオニン残基180におけるネズミC-末端の切形は分子を不活化させ、他方、システイン185におけるおよびそれを越えての切形は十分な活性を有する。185位に位置するシステイン残基はOPGのドメイン4領域においてSS3結合を形成すると予測される。他のTNRF-関連蛋白質におけるこの残基の除去は、生物学的活性を阻害することが従前に示されている(Yanら, J . Biol . Chem . 266 , 12099-12104 (1994))。muOPG[22-180]-Fc は不活性であるが、muOPG[22-185]-Fc は活性であるとする1つの知見は、これらの知見と一致する。これは、Yミノ酸残基22-185はOPG活性についての領域を規定することを示唆する。

これらの知見は、トランスジェニカルに発現されたOPGと同様に、組換えOPG蛋白質も破骨細胞形成アッセイでテストしたときに破骨細胞形成を抑制することを示す。OPGに連続

的に暴露された培養物におけるTRAP+細胞、β3+細胞、F480+細胞の出現を調べる経時的実験は、OPGがTRAP+およびβ3+細胞の出現を阻止するが、F480+細胞の出現は阻止しないことを示す。対照的に、TRAP+およびβ3+細胞は対照培養において培養樹立後4日のように早くに出現し始める。F480+細胞のみがOPGー処理培養で見い出すことができ、それは質的に対照培養と同数で存在するようである。かくして、イン・ビトロにおけるOPG効果のメカニズムは、単球ーマクロファージの出現以後TRAPもしくはβ3インテグリンいずれかを発現する細胞の出現以前において、破骨細胞分化の阻止を含むようである。総括的に、これらの知見は、OPGが骨髄からの単球ーマクロファージ前駆体の一般的増殖および分化に干渉しなく、むしろ単球ーマクロファージ前駆体からの破骨細胞の選択的分化を特異的に阻止することを、示唆する

破骨細胞分化経路においていつ〇PGが阻害的であるかをより厳密に決定するために、イン・ビトロ培養方法の変形法を用いた。Laceyら(前掲)に記載されているこの変形法は破骨細胞前駆体として骨髄マクロファージを使用する。

1/M-CSF中で一晩インキュベーションを行った後、非接着性骨髄細胞を採取し、1,000~2,000 U/m1 CSF-1にてさらに4日間細胞を培養することによって破骨細胞前駆体を誘導する。増殖相と呼ばれる4日の培養の後、非接着細胞を除去する。次いで、骨髄マクロファージである接着性細胞を、2日までの間、1,000-2,000 U/m1 CSF-1 の存在下で、種々の処理に暴露することができる。この2日の期間は中間分化期間と呼ばれる。しかる後、細胞溶解物を再度すすぎ、次いで、終末分化期間と呼ばれる最後の8日間に、ST-2 細胞  $(1\times10^5$  細胞/m1)、デキサメタゾン(100 nM)および1,25  $(OH)_2$  D3 (10 nM)を添加する。テスト剤を同様にこの終末期間に添加することができる。破骨細胞の表現型マーカーの獲得がその終末期間の間に獲得される(Lacey6,前掲)。

huOPG [22-401] -Fc (100ng/m1)を、それを中間、終末期間いずれか、あるいは別法として両分化期間に添加することによって、このモデルにおける破骨細胞形成に対する効果につきテストした。TRAP細胞化学法および溶液アッセイ双方を行った。溶液アッセイの結果を図21に示す。

huOPG [22-401] -Fcは、中間および終末双方、または終末分化相のみに添加した場合に、TRAP活性の出現を阻害した。中間相に添加し、次いですすぐことによって培養から除去した場合には、huOPG [22-401] -Fcは培養溶解物においてTRAP活性の出現を阻止しなかった。細胞化学法の結果は溶液アッセイデータと足並みをそろえている。総括的には、これらの観察は、huOPG [22-401] -Fcに破骨細胞形成への抑制効果の全てを発揮させるには、終末分化期間に存在させる必要があるのみであることを示す。

## B. イン・ビボ $I L 1 - \alpha$ および $I L 1 - \beta$ 攻撃(challenge)実験

IL1は、マウスの頭蓋冠に皮下注射すると、全身的および局所的双方にて骨吸収を増大させる(Boyceら、Endocrinology 125,11 42-1150(1989))。全身効果は、高カルシウム血症の程度によって

評価でき、局所的効果は破骨細胞-媒介応答の相対的大きさを評価することによって組織学的に評価できる。これらの実験の目的は、組換えmu O P G [22-401] - F c が、I L 1 と同一の頭蓋冠領域に皮下注射された場合に I L 1 の局所および/また

は全身作用を修飾できるか否かを判断することにある。

## I L-1β実験

4週齢の雄マウス(ICR Swiss white)を以下の処理群(群当たり5匹のマウス):対照群:IL1処理動物(マウスは2.5 $\mu$ gのIL1- $\beta$ の1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401] ーFc処理動物(マウスは1 $\mu$ gのmuOPG [22-401] ーFcの3注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401] ーFcの3注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401] ーFcおよびIL1- $\beta$ ;高用量muOPG [22-401] ーFcの3注射/日を与えた);高用量muOPG [22-401] ーFcの3注射/日を与えた);高用量muOPG [22-401] ーFcおよびIL1- $\beta$ に分けた。全てのマウスに活性因子またはビヒクル(リン酸緩衝化生理食塩水中0.1%ウシ血清アルブミン)の同一合計数の注射を与えた。最後の注射後の日に全群を犠牲にする。最初の注射の前、第2の注射の4時間後、および第3のIL1注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に体重および血中イオン化カルシウムレベルを測定する。犠牲にした後、頭蓋冠を摘出し、パラフィン切片化のために加工した。

#### IL1-a実験

4週齢の雄マウス(ICR Swiss white)を以下の処理群(群当たり5匹のマウス):対照群:IL1アルファ理動物(マウスは $5\mu$ gのIL1ーアルファの1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]ーFc処理動物(マウスは10 $\mu$ gのmuOPG [22-401]ーFcの1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]ーFcの1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]ーFc処理動物(マウスは10 $\mu$ g muOPG [22-401]ーFcの3注射/日を与えた);高用

量muOPG [22-401] ーFcおよびIL1ー $\alpha$ に分けた。全てのマウスに活性因子またはビヒクルの同一合計数の注射/日を与えた。最後の注射後の日に全群を犠牲にした。最初の注射の前、第2の注射の4時間後、および第3のIL1注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に血中イオン化カルシウムレベルを測定した。最初の注射の前、第2の注射の4時間後および第3のIL1注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に動物の体重を測定した。犠牲にした後、頭蓋冠を摘出し、パラフィン切片化のために加工した。

### 組織学的方法

頭蓋冠骨試料を亜鉛ホルマリン中で固定し、ギ酸中で脱灰し、エタノールにより脱水し、パラフィン中に埋めた。ラムダ縫合に隣接する頭蓋冠により切片(5 $\mu$ m厚さ)を切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色するか、あるいは酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性につき反応させ(Sigmaキット番号387A)、ヘマトキシリンで逆染色した。最も明るいカメラを取り付けた顕微鏡を用い、デジタル化プラテンへの組織学的特徴を追跡することによつて、Osteomeasure(Osteometrics,Atlanta,GA)を用い、組織形態学的方法によりIL1- $\alpha$ 処理マウスにおいて骨吸収を評価した。頭蓋冠の骨髄腔において、破骨細胞数、破骨細胞でライニングされた表面、および腐食された表面を測定した。頭蓋冠の注射および非注射側を別々に測定した。

# 結果

 $IL1-\alpha$ および $IL1-\beta$ は、恐らくは、全身的骨吸収の増加によって、特に第2日において、使用した用量で高カルシウム血症を生じた。高カルシウム血症を答はIL1-ベータ処理マウスにおいてmuOPG[22-401]-Fcによって

阻止され、IL1-アルファで処理したマウスでは有意に減少し、効果は第2日に最も現れた(図22A-22B)。

IL1-アルファおよびベータで処理したマウスの顕蓋冠の組織学的分析は、 IL1処理単独では、破骨細胞数、破骨細胞でライニングされた表面、および腐 食された表面(破骨細胞作用のため深い波形形成を示す表面)を含めた骨吸収の指標において顕著な増加が生じた(図23B、表2)。  $IL1-\alpha$ または $IL1-\beta$ に応答して、骨吸収の増加は頭蓋冠の注射および非注射側で同様であった。 muOPG[22-401]-Fc注射は、<math>IL1-Fルファおよびベータ処理 マウス双方において、およびビヒクル単独を摂取したマウスにおいて、骨吸収を低下させたが、この低下は頭蓋冠のmuOPG[22-401]-Fc注射側でのみ観察された。

法によって局所的に最も顕著なようであり、muOPG[22-401]-Fcは IL1- 誘導高カルシウム血症の効果をなくするという事実は、muOPG[22-401]-Fcが全身的な骨吸収に対してより敏感な効果を有することを示唆する。

表2 1Lー1注射したマウスにおける骨吸収の変数に対するOPGの効果

	破骨細胞表面%骨表面(	面%骨表面 (平均值±S.D.)	腐食した表面%骨表面(平均値±S.D.)	(平均植土S. D. )	破骨細数/mm%強動所 (平均植士S.D.)	騰 (平均植土S. D.)
実験1	非珠卿	海卿	<b>非</b> 进舰	沙湖	非进机	法制
対照	12.36±3.44	9.54±2.46	8.07±3.90	9.75±3.16	32.51±11,09	23.50±10.38
11.1-6(2.5µg/d)	17.18±1.30	$16.40\pm 2.16$	40.66±4.28	$37.53\pm10.28$	71.80±18.76	60.89±5.16
OPG(40µg/d)	$10.12\pm3.71$	5.04±1.66	9.73±4.33	4.19±3.61	32.78±11.09	15.24±7.54
OPC+IL1-B	$18.61 \pm 2.46$	#13.26±2.50	44.87±8.63	#25.94±6.82	69.42±36.29	#47.13±24.26
実験2						
<b>新</b>	11.56±4.22	11.95±2.97	12.67±5.04	10.03±5.13	51.72±23.93	56.03±30.70
1L1-a(5µg/d)	28.81±4.84	23.46±5.76	37.51±5.16	41.10±12.53	113.60±18.04	102.70±32.09
OPG(40µg/d)	14,40±1.00	#4.26±2.54	11,55±4.14	#4.29士3.16	72.28±14.11	#22.65±16.68
OPG+IL1-cx	29.58±8.80	#17.83±3.34	$33.66\pm9.21$	#24.38±8.88	146.10土42.37	#86.56±15.62

#|| 特別側に対して異なる p<0.05 (対t検定)

C. mu O P G [22-401] - F c の成長するマウスにおける全身効果9. 2-15. 7 g の体重範囲の3-4 週齢雄BD F 1 マウスを群当たり10

匹の群に分けた。これらのマウスに生理食塩水またはmuOPG [22-401] -Fc 2.5mg/kg試行を14日間(5mg/kg/日)皮下注射した。マウスを処理前、第7日および第14日にX-線撮影した。最終の注射の24時間後にマウスを犠牲にした。右大腿骨を摘出し、亜鉛ホルマリン中で固定し、ギ酸中で脱灰し、パラフィンに埋めた。遠位大腿骨幹端および大腿骨幹の中央領域を通って切片を切断した。組織形態学による骨密度を、成長板の骨幹端境界から一次および二次海綿を通って大腿骨幹(幹)まで伸びる6つの隣接領域において測定した。各領域は0.5×0.5mm2であった。

### X-線写真の変化

処理の7日後に、対照で観察されたそれに対してOPG処理マウスにおける成長板に関連した海綿において骨密度が増加したゾーンの証拠があった。該効果は遠位大腿骨および近位脛骨中期で特に顕著であった(図24A-24B)。しかしながら、

増加した密度のバンドは椎体、腸骨稜および遠位脛骨ででも現れた。第14日において、不透明な領域が大腿骨および脛骨幹まで広がったが、X-線不透過の強度は減少した。加えて、実験の完了時における大腿骨の長さにおいて、または実験の継続中にわたっての長さの変化において差異はなく、これはOPGは骨成長を変化させないことを意味する。

#### 組織学的変化

速位大腿骨幹端は成長板からの距離 1. 1 ないし 2. 6 5 mmの距離の領域において骨密度の増加を示した(図 2 5 および 2 6 A - 2 6 B)。これは、マウスにおいて破骨細胞-媒介骨吸収によって骨が迅速に除去されている領域である。これらの迅速に成長している若いマウスにおいて、OPG処理で観察されたこの領域における骨の増加は、骨吸収の阻害と一致する。

D. ラットにおける卵巣摘出によって誘導された骨喪失に対するオステオプロ テゲリンの効果

12週齢の雌Fisherラットを卵巣摘出し(OVX)、あるいは偽手術し、遠位大腿骨幹端における骨密度につきデュアルX-線吸収実験(DEXA)を

行った。回復期間の3日後、動物に以下のごとくに14日間の間毎日注射した: 10匹の偽

手術動物はビヒクル(リン酸緩衝化生理食塩水)を与えた;10匹の0VX動物にはビヒクル(リン酸緩衝化生理食塩水)を与えた;6匹の0VX動物には0PG-Fc 5mg/kgを皮下投与した;6匹の0VX動物にはパミドロネート(PAM)5mg/kgを皮下投与した;6匹の0VX動物にはエストロゲン(ESTR) $40\mu$ g/kgを皮下投与した。処理の7および14日後、動物をDEXAによって骨密度を測定した。最後の注射の2日後に動物を殺し、右脛骨および大腿骨を組織学的評価のために摘出した。

骨密度のDEXA測定は、OPG-Fcによって阻止された卵巣摘出後の骨減少低下の傾向を示した。その効果は公知の抗再吸収剤のエストロゲンおよびパノドロメネートと同様であった(図27)。組織形態学的分析により、未処理OVXラットで観察されたものよりも有意に高いOVXにおける骨密度を生じるOPG-Fc処理での観察が確認された。これらの結果により、卵巣摘出後による内因性エストロゲンの中止に伴う骨喪失におけるOPGの活性が確認された。

#### イン・ビボの要約

組換えOPGのイン・ビボ作用はOPGトランスジェニック

マウスで観察された変化と対応する。OPGトランスジェニックマウスで観察された破骨細胞数の減少は、正常マウスおよび $IL1-\alpha$ または $IL1-\beta$ で処理したマウス双方における頭蓋冠に局所的に組換えOPGを注射することによって再現された。OPGトランスジェニックマウスは、大理石骨病に罹り、誕生から第1日に向けて、骨髄は成長板から伸びる骨および再形成されていない軟骨で進行的に充填される。また、正常な第3週齢(成長する)マウスにおいて、OPG処理は、軟骨内骨形成の領域において、骨および再形成されていない軟骨の保持を導き、これはX-線撮影によって観察された効果であり、組織学的に確認された。かくして、組換えOPGはトランスジェニック動物で観察されたものと同様の正常動物における表現型変化を生じ、該変化は骨吸収OPG-誘導阻害と一

致する。破骨細胞形成のイン・ビトロアッセイに基づくと、この阻害のうちの有意な割合が損じられた破骨細胞形成によるものである。この仮説と一致して、OPGはラットにおいて卵巣摘出誘導骨粗鬆症を阻止する。このモデルにおける骨喪失は活性化された破骨細胞によって媒介されることが知られており、これは、一次骨粗鬆症の治療におけるOPGについての役割を示唆する。

#### 実施例12

OPGのPEG化誘導体

還元的アルキル化によるN-末端PEG-OPGコンジュゲートの調製

huOPG met [22-194] P25Aを25-50mM NaOAc、pH4.5-4.8に緩衝液交換し、2-5mg/mlまで濃縮した。この溶液を用いて、5-7  $\mathbb C$ にて単官能性PEGアルデヒドでのOPG還元的アルキル化を行った。PEG単官能性アルデヒド(線状または分岐状、MW=1ないし57kDa)(Shearwater Polymersから入手可能)を、OPG1モル当たりPEGアルデヒド2-4モルを構成する量にて、固体として、OPG溶液に添加した。蛋白質溶液へのポリマーの溶解の後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加して、冷DI水中で1-1.6 Mの新たに調製したストック溶液からの反応混合物中、15 ないし20 mMの最終濃度とした。反応の進行およびOPG PEG化の程度は、100 mM NaPO4、0.5 M NaCl、10 %エタノール、pH6.9で溶出するG3000SWxLカラム(Toso Haas)でのサイズ排除HPLCによってモニ

ターした。典型的には、反応を16-18時間進行させ、しかる後、反応混合物を6-8倍希釈し、pHを3.5-4まで低下させた。反応混合物を、30cm /hの流速で25カラム容量にわた30.75M /m1 NaClまでの直線グラジエントにて20mM /m2 NaOAc /m2 PH4で溶出す30 CH2で換クロマトグラフィー /m3 CH2 SP /m4 Hiload /m4 Tharmacial によって分画した。モノー、ジーまたはPEG化OPGの画分をプールし、SEC /m4 HPL CおよびSDS-PAGEによって性質を調べ特徴付けた。/m5 N-末端配列決定に

よって、モノPEG-OPGコンジジュゲート(ほとんどの場合における主要反応生成物)は98%N-末端PEG-修飾OPGであると判断された。

この手法は、一般に、以下のN-末端PEG-OPGコンジョゲート(ここに、OPGはhuOPG met [22-194] P25Aであった)を調製するのに使用した:5kD モノPEG、10kD モノ9はPEG、12kD モノ9EG、20kD ジ9EG、20kD ジ9EG 、20kD 9EG 、20kD 9EG 、20kD 9EG 、20kD 9

G、57kD ジPEG、25kD トリPEG。

#### アシル化によるPEG-OPGコンジョゲートの調製

huOPG met [22-194] P25Aを50mM BICINE緩衝液、pH8に緩衝液交換し、2-3mg/mlまで濃縮した。この溶液を用いて、室温にて、単官能性PEG NーヒドロキシスクシニンイミジルエステルによるOPGアシル化を行った。PEG Nーヒドロキシスクシニンイミジルエステル (線状または分岐状、MW=1 ないし57kDa) (Shearwater Polymersから入手可能)を、OPG1モル当たりPEG Nーヒドロキシスクシニンイミジルエステル4-8モルを構成する量にて、固体として、OPG溶液に添加した。反応の進行およびOPG PEG化の程度は、100mMNaPO4、0.5MNaCl、10%エタノール、pH6.9で溶出するG3000SWxLカラム(TosoHaas)でのサイズ排除HPLCによってモニターした。典型的には、反応を1時間進行させ、しかる後、反応混合物を6-8倍希釈し、pH63.5-4まで低下させた。反応混合物を、30cm/hの流速で25カラム容量にわたる0.75MNaClまでの直線グラジエントにて20mMNa

OAc pH4で溶出するイオン交換クロマトグラフィー(HP SP HiL oad 16/10、Pharmacia)によって分画した。モノー、ジーまたはPEG化OPGの画分をプールし、SEC HPLCおよびSDS-PAG

Eによって性質を調べた。

この手法は、一般に、以下のN-末端PEG-OPGコンジョゲートを調製するのに使用した:5kD ポリPEG、20kD ポリPEG、40kD ポリPEG、50kD ポリPEG。

### ダイマーPEG-OPGの調製

中性に近いp Hにてリン酸緩衝液中、h u O P G met [22-194] P 25 A  $even{2}$  A  $even{2}$  M  $even{2}$  I にてチオール化のために調製する。p H  $even{2}$  H  $even{2}$  P  $even{2}$  H  $even{2}$  A  $even{2}$  C  $even{2}$  C  $even{2}$  F  $even{2}$  I  $even{2}$  H  $even{2}$  A  $even{2}$  C  $even{2}$  F  $even{2}$  A  $even{2}$  C  $even{2}$  F  $even{2}$  A  $even{2}$  C  $even{2}$  C  $even{2}$  A  $even{2}$  C  $even{2}$ 

PGを種々のチオール特異的架橋化学法に付す。ジスルフィド結合ダイマーを生成させるために、>1mg/mlのチオール化OPGを、わずかに塩基性のリン酸緩衝液中での透析によって空気酸化を受けさせる。pH6.5のリン酸緩衝液中、架橋剤:OPGの0.6×モル比にて、ビスーマレイミド架橋剤、N,Nービス(3ーマレイミドプロピアニル)-2ーヒドロキシ1,3ープロパンを>1mg/mlのチオール化OPGと反応させることによって、共有結合チオエーテルOPGダイマーを調製する。同様に、pH6.5のリン酸緩衝液中、化学量論的量のビスーマレイミドPEG架橋剤を>1mg/mlのチオール化OPGと反応させることによってPEGダンベルを生成させる。前記ダイマーコンジュゲートのいずれも、イオン交換もしくはサイズ排除クロマトグラフィーいずれかを用いてさらに精製できる。

ダイマーPEG-OPGコンジュゲート(ここに、OPGは前記手法を用いて 調製したhuOPGmet[22-194]P25Aである)はジスルフィド ー結合OPGダイマー、脂肪族アミン型架橋剤との共有結合チオエーテルOPG ダイマー、3. 4kDおよび8kDPEGダンベルおよびモノベル を含む。

実施例11Aに記載した破骨細胞成熟化アッセイを用いてイン・ビトロに活性につき、および実施例11Cに記載したごとくマウスへの注射の後に骨密度の増加を測定することによってイン・ビボ活性につき、PEG-OPGコンジュゲートをテストした。イン・ビボ活性は以下の表3に示す。

表 3 ペギュレート化された O P G のイン・ビボ生物学的活性

OPG構築体	脛骨密度の増加
W-000 + [00 +04]	
MuOPG met[22-194]	-
MuOPG met[22-194] 5k PEG	+
MuOPG met[22-185] 20k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A	-
HuOPG met[22-194] P25A 5k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 20k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 31k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 57k PEG	†
HuOPG met[22-194] P25A 12k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 20k 分	+
岐 PEG	
huOPG met[22-194] P25A 8k PEG	+
ダイマー	
huOPG met[22-194] P25A ジス	+
ルフィド架橋	

本発明を何かその好ましい具体例であるかにつき記載してきたが、本発明は開示の具体例に限定されるものではなく、その反対に、添付の請求の範囲の精神および範囲内に含まれる種々の修飾および同等物をカバーさせる意図であり、その範囲はかかる修飾および同等物を含むように最も広い解釈が容認されるべきである。

## 配 列 表

配列番号:1

配列の特徴

配列の長さ:36塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:1

AAAGGAAGGA AAAAAGCGGC CGCTACANNN NNNNNT

36

配列番号: 2

配列の特徴

配列の長さ:16塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:2

TCGACCCACG CGTCCG

16

配列番号:3

配列の特徴

配列の長さ:12塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:3

GGGTGCGCAG GC 12

配列番号: 4

配列の特徴

配列の長さ:18塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:4

TGTAAAACGA CGGCCAGT

18

配列番号:5

配列の特徴

配列の長さ:18塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:5

CAGGAAACAG CTATGACC

18

配列番号:6

配列の特徴

配列の長さ:20塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:6

CAATTAACCC TCACTAAAGG

20

配列番号: 7

配列の特徴

配列の長さ:23塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:7

GCATTATGAC CCAGAAACCG GAC

23

配列番号:8

配列の特徴

配列の長さ:23塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:8

AGGTAGCGCC CTTCCTCACA TTC

23

配列番号:9

配列の特徴

配列の長さ:30塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:9

GACTAGTCCC ACAATGAACA AGTGGCTGTG

30

配列番号:10

配列の特徴

配列の長さ:45塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:10

ATAAGAATGC GGCCGCTAAA CTATGAAACA GCCCAGTGAC CATTC

4.5

配列番号:11

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:11

GCCTCTAGAA AGAGCTGGGA C

21

配列番号:12

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:12

CGCCGTGTTC CATTTATGAG C

21

配列番号: 1 3

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:13

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

配列番号:14

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:14

GTTGCACTCC TGTTTCACGG TCTG

24

配列番号: 15

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:15

配列番号:16

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:16

TAACTTTTAC AGAAGAGCAT CAGC

24

配列番号:17

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:17

AGCGCGGCCG CATGAACAAG TGGCTGTGCT GCG

配列番号:18

配列の特徴

配列の長さ: 31塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:18

AGCTCTAGAG AAACAGCCCA GTGACCATTC C

31

配列番号:19

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:19

GTGAAGCTGT GCAAGAACCT GATG

## 配列番号: 2 0

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:20

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

配列番号:21

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:21

配列番号: 2 2

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:22

AGCGCGGCCG CGGGGACCAC AATGAACAAG TTG

33

配列番号: 2 3

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:23

AGCTCTAGAA TTGTGAGGAA ACAGCTCAAT GGC

配列の特徴

配列の長さ:39塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:24

ATAGCGGCCG CTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCAC

39

配列番号: 2 5

配列の特徴

配列の長さ: 4 5 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:25

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:26

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号:27

配列の特徴

配列の長さ: 43塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:27

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTCA CGGATTGAAC CTG

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:28

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号: 29

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:29

TCCGTAAGAA ACAGCCCAGT GACC

24

配列の特徴

配列の長さ:31塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:30

CCTCTGCGGC CGCTGTTGCA TTTCCTTTCT G

31

配列番号: 3 1

配列の特徴

配列の長さ:19アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:31

Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His

Gln Leu Leu

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:32

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号: 3 3

配列の特徴

配列の長さ:34塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:33

CCTCTGCGGC CGCACACACG TTGTCATGTG TTGC

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型;核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:34

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号: 3 5

配列の特徴

配列の長さ: 3 4 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:35

CCTCTGCGGC CGCCTTTTGC GTGGCTTCTC TGTT

配列の特徴

配列の長さ:37塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:36

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

配列番号:37

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:37

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTTA CTGAATGG

配列の特徴

配列の長さ:37塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:38

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

配列番号: 3 9

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:39

33

配列番号: 4 0

配列の特徴

配列の長さ:35塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:40

CCGAAGCTTC CACCATGAAC AAGTGGCTGT GCTGC

35

配列番号: 4 1

配列の特徴

配列の長さ:40塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:41

CCTCTGTCGA CTATTATAAG CAGCTTATTT TCACGGATTG

配列番号: 4 2

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:42

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号: 43

配列の特徴

配列の長さ:35塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:43

CCTCTGTCGA CTTAACACAC GTTGTCATGT GTTGC

配列番号: 4 4

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:44

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号: 45

配列の特徴

配列の長さ:35塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: C D N A

配列の記載:配列番号:45

CCTCTGTCGA CTTACTTTTG CGTGGCTTCT CTGTT

35

## 配列の特徴

配列の長さ:1537塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:46

GTGAAGAGCG	TGAAGAGCGG	TTCCTCCTTT	CAGCAAAAA	CCCCTCAAGA	CCCGTTTAGA	60
GGCCCCAAGG	GGTTATGCTA	GTTATTGCTC	AGCGGTGGCA	GCAGCCAACT	CAGCTTCCTT	120
TCGGGCTTTC	TTCTTCTTCT	TCTTCTTTCC	GCGGATCCTC	GAGTAAGCTT	CCATGGTACC	180
CTGCAGGTCG	ACACTAGTGA	GCTCGAATTC	CAACGCGTTA	ACCATATGTT	ATTCCTCCTT	240
TAATTAGTTA	AAACAAATCT	AGAATCAAAT	CGATTAATCG	ACTATAACAA	ACCATTTTCT	300
TGCGTAAACC	TGTACGATCC	TACAGGTACT	TATGTTAAAC	AATTGTATTT	CAAGCGATAT	360
AATAGTGTGA	CAAAAATCCA	ATTTATTAGA	ATCAAATGTC	AATCTATTAC	CGTTTTAATG	420
ATATATAACA	CGCAAAACTT	GCGACAAACA	ATAGGTAAGG	ATAAAGAGAT	GGGTATGAAA	480
GACATAAATG	CCGACGACAC	TTACAGAATA	ATTAATAAAA	TTAAAGCCTG	TAGAAGCAAT	540
AATGATATTA	ATCAATGCTT	ATCTGATATG	ACTAAAATGG	TACATTGTGA	ATATTATTTA	600
CTCGCGATCA	TTTATCCTCA	TTCTATGGTT	AAATCTGATA	TTTCAATTCT	GGATAATTAC	660
CCTAAAAAAT	GGAGGCAATA	TTATGATGAC	GCTAATTTAA	TAAAATATGA	TCCTATAGTA	720
GATTATTCTA	ACTCCAATCA	TTCACCGATT	AATTGGAATA	TATTTGAAAA	CAATGCTGTA	780

	AATAAAAAT	CTCCAAATGT	AATTAAAGAA	GCGAAATCAT	CAGGTCTTAT	CACTGGGTTT	840
•	AGTTTCCCTA	TTCATACTGC	TAATAATGGC	TTCGGAATGC	TTAGTTTTGC	ACATICAGAG	900
4	AAAGACAACT	atatagatag	TTTATTTTTA	CATGCGTGTA	TGAACATACC	ATTAATTGTT	960
(	CCTTCTCTAG	TTGATAATTA	TCGAAAAATA	AATATAGCAA	ATAATAAATC	AAACAACGAT	1020
:	FTAACCAAAA	GAGAAAAAGA	ATGTTTAGCG	TGGGCATGCG	AAGGAAAAAG	CTCTTGGGAT	1080
ž	ATTTCAAAAA	TATTAGGCTG	TAGTAAGCGC	ACGGTCACTT	TCCATTTAAC	CAATGCGCAA	1140
1	ATGAAACTCA	ATACAACAAA	CCGCTGCCAA	AGTATTTCTA	AAGCAATTTT	AACAGGAGCA	1200
Į	ATTGATTGCC	CATACTTTAA	AAGTTAAGTA	CGACGTCCAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	1260
P	TAAACAAAA	GAGTTTGTAG	AAACGCAAAA	AGGCCATCCG	TCAGGATGGC	CTTCTGCTTA	1320
F	TTTGATGCC	TGGCAGTTTA	TGGCGGGCGT	CCTGCCCGCC	ACCCTCCGGG	CCGTTGCTTC	1380
G	CAACGTTCA	AATCCGCTCC	CGGCGGATTT	GTCCTACTCA	GGAGAGCGTT	CACCGACAAA	1440
C	CAACAGATAA	AACGAAAGGC	CCAGTCTTTC	GACTGAGCCT	TTCGTTTTAT	TTGATGCCTG	1500
G	CAGTTCCCT	ACTCTCGCAT	GGGGAGACCA	TGCATAC			1537

配列の特徴

配列の長さ:48塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の記載:配列番号:47

配列の特徴

配列の長さ:55塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:48

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GGTAC

55

配列番号: 4 9

配列の特徴

配列の長さ:49塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:49

CGAATTCCAA CGEGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

配列の特徴

配列の長さ:1546塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:50

GC	GTAACGTA	TGCATGGTCT	CCCCATGCGA	GAGTAGGGAA	CTGCCAGGCA	TCAAATAAAA	60
CG	AAAGGCTC	AGTCGAAAGA	CIGGGCCIII	CGTTTTATCT	GTTGTTTGTC	GGTGAACGCT	120
CTO	CCTGAGTA	GGACAAATCC	GCCGGGAGCG	GATTTGAACG	TTGCGAAGCA	ACGGCCCGGA	180
GG	GTGGCGGG	CAGGACGCCC	GCCATAAACT	GCCAGGCATC	AAATTAAGCA	GAAGGCCATC	240
CT	GACGGATG	GCCTTTTTGC	GTTTCTACAA	ACTCTTTTGT	TTATTTTCT	AAATACATTC	300
AA	ATATGGAC	GTCGTACTTA	ACTTTTAAAG	TATGGGCAAT	CAATTGCTCC	TGTTAAAATT	360
GC	TTTAGAAA	TACTTTGGCA	GCGGTTTGTT	GTATTGAGTT	TCATTTGCGC	ATTGGTTAAA	420
TG	GAAAGTGA	CCGTGCGCTT	ACTACAGCCT	AATATTTTTG	AAATATCCCA	AGAGCTTTTT	480
CC	TTCGCATG	CCCACGCTAA	ACATTCTTTT	TCTCTTTTGG	TTAAATCGTT	GTTTGATTTA	540
тт	ATTTGCTA	TATTTATTTT	TCGATAATTA	TCAACTAGAG	AAGGAACAAT	TAATGGTATG	600
тт	CATACACG	CATGTAAAAA	TAAACTATCT	ATATAGTTGT	CTTTCTCTGA	ATGTGCAAAA	660
CT	AAGCATTC	CGAAGCCATT	ATTAGCAGTA	TGAATAGGGA	AACTAAACCC	AGTGATAAGA	720
CC	TGATGATT	TCGCTTCTTT	AATTACATTT	GGAGATTTTT	TATTTACAGC	ATTGTTTTCA	780
AA	TATATTCC	AATTAATCGG	TGAATGATIG	GAGTTAGAAT	AATCTACTAT	AGGATCATAT	840

TTTATTAAAT	TAGCGTCATC	ATAATATTGC	CTCCATTTTT	TAGGGTAATT	ATCCAGAATT	900
GAAATATCAG	ATTTAACCAT	AGAATGAGGA	TAAATGATCG	CGAGTAAATA	ATATTCACAA	960
TGTACCATTT	TAGTCATATC	AGATAAGCAT	IGATTAATAT	CATTATTGCT	TCTACAGGCT	1020
TTAATTTTAT	TAATTATTCT	GTAAGTGTCG	TCGGCATTTA	TGTCTTTCAT	ACCCATCTCT	1080
TTATCCTTAC	CTATTGTTTG	TCGCAAGTTT	TGCGTGTTAT	ATATCATTAA	AACGGTAATA	1140
GATTGACATT	TGATTCTAAT	AAATTGGATT	TTTGTCACAC	TATTATATCG	CTTGAAATAC	1200
AATTGTTTAA	CATAAGTACC	TGTAGGATCG	TACAGGTTTA	CGCAAGAAAA	TGGTTTGTTA	1260
TAGTCGATTA	ATCGATTTGA	TTCTAGATTT	GTTTTAACTA	ATTAAAGGAG	GAATAACATA	1320
TGGTTAACGC	GTTGGAATTC	GAGCTCACTA	GTGTCGACCT	GCAGGGTACC	ATGGAAGCTT	1380
ACTCGAGGAT	CCGCGGAAAG	AAGAAGAAGA	AGAAGAAAGC	CCGAAAGGAA	GCTGAGTTGG	1440
CTGCTGCCAC	CGCTGAGCAA	TAACTAGCAT	AACCCCTTGG	GGCCTCTAAA	CGGGTCTTGA	1500
GGGGTTTTTT	GCTGAAAGGA	GGAACCGCTC	TTCACGCTCT	TCACGC		1546

配列番号: 5 1

配列の特徴

配列の長さ: 47塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の記載:配列番号:51

TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGC TAGCGTTAAC GCGTTGG

配列番号: 5 2

配列の特徴

配列の長さ:49塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:52

AATTCCAACG CGTTAACGCT AGCATGATGG TGATGGTGAT GATGTTTCA

49

配列番号: 5 3

配列の特徴

配列の長さ:141塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:53

CTAATTCCGC TCTCACCTAC CAAACAATGC CCCCTGCAA AAAATAAATT CATATAAAAA 60

ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC 120

TGGCGGTGAT ACTGAGCACA T 141

配列番号: 5 4

配列の特徴

配列の長さ:147塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:54

CGATGTGCTC AGTATCACCG CCAGTGGTAT TTATGTCAAC ACCGCCAGAG ATAATTTATC 60
ACCGCAGATG GTTATCTGTA TGTTTTTAT ATGAATTTAT TTTTTGCAGG GGGGCATTGT 120
TTGGTAGGTG AGAGCGGAAT TAGACGT 147

配列番号:55

配列の特徴

配列の長さ:55塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:55

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GGTAC

5.5

配列番号:56

配列の特徴

配列の長さ:49塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:56

CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

49

配列番号:57

配列の特徴

配列の長さ:668塩基対

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:57

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAA CCCCTCAAGA CCCGTTTAGA	60
GGCCCCAAGG GGTTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT CAGCTTCCTT	120
TCGGGCTTTC TTCTTCTT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC	180
CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCCTCCTT	240
TAATTAGTTA ACTCAAATCT AGAATCAAAT CGATAAATTG TGAGCGCTCA CAATTGAGAA	300
TATTAATCAA GAATTTTAGC ATTTGTCAAA TGAATTTTTT AAAAATTATG AGACGTCCAT	360
ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG	420
TCAGGATGGC CTTCTGCTTA ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC	480
ACCCTCCGGG CCGTTGCTTC GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA	540
GGAGAGCGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT	600
TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTTCCCT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATACGTT	660
ACGCACGT	668

配列番号: 5 8

配列の特徴

配列の長さ:726塩基対

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:58

GCGTAACGTA	TGCATGGTCT	CCCCATGCGA	GAGTAGGGAA	CTGCCAGGCA	TCAAATAAAA	60
CGAAAGGCTC	AGTCGAAAGA	CTGGGCCTTT	CGTTTTATCT	GTTGTTTGTC	GGTGAACGCT	120
CTCCTGAGTA	GGACAAATCC	GCCGGGAGCG	GATTTGAACG	TTGCGAAGCA	ACGGCCCGGA	180
GGGTGGCGGG	CAGGACGCCC	GCCATAAACT	GCCAGGCATC	AAATTAAGCA	GAAGGGGCCT	240
CCCACCGCCC	GTCCTGCGGG	CGGTATTTGA	CGGTCCGTAG	TTTAATTCGT	CTTCGCCATC	300
CTGACGGATG	GCCTTTTTGC	GTTTCTACAA	ACTCTTTTGT	TTATTTTTCT	AAATACATTC	360
AAATATGGAC	GTCTCATAAT	TTTTAAAAAA	TTCATTTGAC	AAATGCTAAA	ATTCTTGATT	420
AATATTCTCA	ATTGTGAGCG	CTCACAATTT	ATCGATTTGA	TTCTAGATTT	GTTTTAACTA	480
attaaagg <b>ag</b>	GAATAACATA	TGGTTAACGC	GTTGGAATTC	GAGCTCACTA	GTGTCGACCT	540
GCAGGGTACC	ATGGAAGCTT	ACTCGAGGAT	CCGCGGAAAG	AAGAAGAAGA	AGAAGAAAGC	600
CCGAAAGGAA	GCTGAGTTGG	CTGCTGCCAC	CGCTGAGCAA	TAACTAGCAT	AACCCCTTGG	660
GGCCTCTAAA	CGGGTCTTGA	GGGGTTTTTT	GCTGAAAGGA	GGAACCGCTC	TTCACGCTCT	720
TCACGC						726

配列番号: 5 9

配列の特徴

配列の長さ: 4 4 塩基対

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:59

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT GGAC

44

配列番号:60

配列の特徴

配列の長さ:27塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:60

GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAAC

27

配列番号: 6 1

配列の特徴

配列の長さ:102塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:61

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTACCCGGCG 60

GACATTTATC ACACAGCAGC TGATGAGAAG TTTCTTCATC CA 102

配列番号:62

配列の特徴

配列の長さ:19アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:62

Met Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro 1 5 10 15

Gly Thr Tyr

配列の特徴

配列の長さ:84塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:63

TATGGAAACT TTTCCTCCAA AATATCTTCA TTATGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT 60

GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC 84

配列番号:64

配列の特徴

配列の長さ:78塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:64

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT

60

TTGGAGGAAA AGTTTCCA

78

配列番号: 6 5

配列の特徴

配列の長さ: 4 4 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:65

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTCACGGATT GAAC

44

配列番号:66

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:66

GTGCTCCTGG TACCTACCTA AAACAGCACT GCACAGTG

38

配列番号:67

配列の特徴

配列の長さ:84塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:67

TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA TTACGATCCG GAAACTGGTC ATCAGCTGCT 60

GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC 84

配列番号: 68

配列の特徴

配列の長さ:78塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:68

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCCA 78

配列番号:69

配列の特徴

配列の長さ:54塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:69

TATEGACCCA GAAACTEGTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC 54

配列番号:70

配列の特徴

配列の長さ:48塩基対

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:70

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC TGGGTCCA

48

配列番号:71

配列の特徴

配列の長さ:87塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:71

TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCATTACGAT CCGGAAACTG GTCATCAGCT 60

GCTGTGTGAT AAATGTGCTC CGGGTAC 87

配列番号:72

配列の特徴

配列の長さ:81塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:72

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCTTTC A 81

配列番号:73

配列の特徴

配列の長さ:71塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:73

GTTCTCCTCA TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGA AACTCTGCCT CCAAAATACC

60

TGCATTACGA T

71

配列の特徴

配列の長さ:43塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:74

GTTCTCCTCA TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCA 43

配列番号:75

配列の特徴

配列の長さ:76塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:75

47

TACGCACTGG ATCCTTAATG ATGGTGATGG TGATGATGTA AGCAGCTTAT TTTCACGGAT 60

TGAACCTGAT TCCCTA 76

配列番号:76

配列の特徴

配列の長さ:47塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:76

GTTCTCCTCA TATGAAATAC CTGCATTACG ATCCGGAAAC TGGTCAT

配列の特徴

配列番号:77

配列の長さ: 43塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:77

## GTTCTCCTAT TAATGAAATA TCTTCATTAT GATGAAGAAA CTT

43

配列番号:78

配列の特徴

配列の長さ:40塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:78

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT

40

配列番号:79

配列の特徴

配列の長さ:40塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:79

GTTCTCCTCA TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA

40

配列番号:80

配列の特徴

配列の長さ: 43塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:80

TACGCACTGG ATCCTTATGT TGCATTTCCT TTCTGAATTA GCA

43

配列番号:81

配列の特徴

配列の長さ:18塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載;配列番号:81

CCGGAAACAG ATAATGAG

18

配列番号: 8 2

配列の特徴

配列の長さ:18塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:82

GATCCTCATT ATCTGTTT

18

配列番号:83

配列の特徴

配列の長さ:30塩基対

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

配列の記載:配列番号:83

CCGGAAACAG AGAAGCCACG CAAAAGTAAG

30

配列番号:84

配列の特徴

配列の長さ:30塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:84

GATCCTTACT TTTGCGTGGC TTCTCTGTTT

30

配列番号: 8 5

配列の特徴

配列の長さ:12塩基対

12

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:85

TATGTTAATG AG

配列番号:86

配列の特徴

配列の長さ:14塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:86

GATCCTCATT AACA

配列番号:87

配列の特徴

配列の長さ:21塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:87

TATGTTCCGG AAACAGTTAA G

21

配列番号:88

配列の特徴

配列の長さ:23塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:88

GATCCTTAAC TGTTTCCGGA ACA

23

配列番号:89

## 配列の特徴

配列の長さ:36塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:89

TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATAAG

36

配列番号:90

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:90

38

配列番号: 9 1

配列の特徴

配列の長さ:100塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:91

CTAGCGACGA CGACGACAAA GAAACTCTGC CTCCAAAATA CCTGCATTAC GATCCGGAAA 60

CTGGTCATCA GCTGCTGTGT GATAAATGTG CTCCGGGTAC 100

配列番号:92

配列の特徴

配列の長さ:92塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60

TTGGAGGCAG AGTTTCTTTG TCGTCGTCGT CG

92

配列番号: 9 3

配列の特徴

配列の長さ:26塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:93

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGA

26

配列番号:94

配列の特徴

配列の長さ:50塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:94

TTTGTTTTAA CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATATGAGAGG ATCGCATCAC

50

配列番号:95

配列の特徴

配列の長さ:50塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:95

CATCACCATC ACGAAACCTT CCCGCCGAAA TACCTGCACT ACGACGAAGA

50

配列番号:96

配列の特徴

配列の長さ: 49塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:96

AACCTCCCAC CAGCTGCTGT GCGACAAATG CCCGCCGGGT ACCCAAACA

49

配列番号: 97

配列の特徴

配列の長さ:26塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:97

TGTTTGGGTA CCCGGCGGGC ATTTGT

26

配列番号: 9 8

配列の特徴

配列の長さ:50塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:98

CGCACAGCAG CTGGTGGGAG GTTTCTTCGT CGTAGTGCAG GTATTTCGGC

50

配列番号:99

配列の特徴

配列の長さ: 49塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:99

GGGAAGGTTT CGTGATGGTG ATGGTGATGC GATCCTCTCA TATTTTATT

49

配列番号:100

配列の特徴

配列の長さ:50塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:100

CCTCCTTTAA TTAGTTAAAA CAAATCTAGT ATCAAATCGA TTGTGTTTGT

50

配列番号: 1 0 1

配列の特徴

配列の長さ:59塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:101

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG 59

配列番号:102

配列の特徴

配列の長さ:48塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:102

## CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAGAAA CTTTTCCTCC AAAATATC

48

配列番号:103

配列の特徴

配列の長さ: 31塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の特徴

配列の長さ:59塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:104

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG 59

配列番号:105

配列の特徴

配列の長さ:54塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:105

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAAAAA AAGAAACTTT TCCTCCAAAA TATC

配列の特徴

配列の長さ: 3 1 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:106

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

31

配列番号:107

配列の特徴

配列の長さ: 4 4 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:107

CAGCCCGGGT AAAATGGAAA CGTTTCCTCC AAAATATCTT CATT

4 4

配列の特徴

配列の長さ: 4 4 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:108

CGTTTCCATT TTACCCGGGC TGAGCGAGAG GCTCTTCTGC GTGT

44

配列番号:109

配列の特徴

配列の長さ: 45塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の特徴

配列の長さ:39塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:110

CCATTTTACC CGGGCTGAGC GAGAGGCTCT TCTGCGTGT

39

配列番号:111

配列の特徴

配列の長さ:36塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:111

GAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

配列の特徴

配列の長さ:34塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:112

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTCACGG ATTG

34

配列番号:113

配列の特徴

配列の長さ:36塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:113

AAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

36

配列の特徴

配列の長さ:35塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:114

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTTACTG ATTGG

35

配列番号: 1 1 5

配列の特徴

配列の長さ:102塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TGCTCCAAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60 AACTAGTCAT CAGCTGCTGT GTGATAAATG TCCGCCGGGT AC

102

配列番号:116

配列の特徴

配列の長さ:94塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:116

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACTAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60 TTGGAGCAAA AGTTTCCATA TGTTATTCCT CCTT 94

配列番号:117

配列の特徴

配列の長さ:62塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:117

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TCCTGCTAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60

AA 62

配列番号:118

配列の特徴

配列の長さ:62塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:118

CTAGTTTCTT CATCATAATG AAGATATTTA GCAGGAAAAG TTTCCATATG TTATTCCTCC 60

TT 62

配列番号: 1 1 9

配列の特徴

配列の長さ:51アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:119

Tyr His Tyr Tyr Asp Gln Asn Gly Arg Met Cys Glu Glu Cys His Met L 5 10 15

Cys Gln Pro Gly His Phe Leu Val Lys His Cys Lys Gln Pro Lys Arg 20 25 30

Asp Thr Val Cys His Lys Pro Cys Glu Pro Gly Val Thr Tyr Thr Asp 35 40 45

Asp Trp His 50

配列番号:120

配列の特徴

配列の長さ:2432塩基対

配列の型:核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

## (ix)配列の特徴:

配列を表す記号:CDS

存在位置: 1 2 4 . . 1 3 2 6

ATC	AAAG	GCA (	3GGC	ATAC'	rr co	CTGT:	rgcco	C AG	ACCT	FATA	TAA	AACG'	TCA '	TGTT	CGCCTG	60
GGC	AGCA	GAG A	AAGC	ACCT	AG C	ACTG	GCC2	A GC	GCT	SCCG	CCT	GAGG'	TTT (	CCAG	AGGACC	120
ACA														GAC Asp		168
														CAT His 30		216
														CCT Pro		264
														TGT Cys		312
														GAT Asp		360
													_	AAA Lys		408
														GGG Gly 110		456
														CCA Pro		504
														TGC Cys		552

		Pro	GAT Asp									Ser				600
	Arg		CAC His			Суз					Leu					648
			GCA Ala		His					Ser						696
									Leu					Phe	TTC Phe	744
			Val					Ile					Ser		CTG Leu	792
												Ser			AGG Arg	840
ATA Ile 240	AAA Lys	CGG Arg	AGA Arg	CAC His	AGC Ser 245	TCG Ser	CAA Gln	GAG Glu	CAA Gln	ACT Thr 250	TTC Phe	CAG Gln	CTA Leu	CTT Leu	AAG Lys 255	888
Leu	Trp	Lys	CAT His	Gln 260	Asn	Arg	Asp	Gln	G1u 265	Met	Val	Lys	Lys	11e 270	Ile	936
Gln	Asp	Ile	GAC Asp 275	Leu	Cys	Glu	Ser	Ser 280	Val	Gln	Arg	His	Ile 285	Gly	His	984
Ala	Asn	Leu 290	ACC Thr	Thr	Glu	Gln	Leu 295	Arg	Ile	Leu	Met	Glu 300	Ser	Leu	Pro	1032
Gly	Lys 305	Lys	ATC Ile	Ser	Pro	310	Glu	Ile	Glu	Arg	Thr 315	Arg	Lys	Thr	Суз	1080
120 320	Pro	Ser	GAG Glu	Gln	125 325	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser 330	Leu	Trp	Arg	Ile	Lys 335	1128
Asn	Gly	Asp		Asp 340	Thr	Leu	ГЛЗ	G1y	Leu 345	Met	Tyr	Ala	Leu	Lys 350	Hìs	1176
TTG Leu	AAA Lys	GCA Ala	TAC Tyr 355	CAC His	TTT Phe	CCC Pro	ГЛЗ	ACC Thr 360	GTC Val	ACC Thr	CAC His	AGT Ser	CTG Leu 365	AGG Arg	AAG Lys	1224

ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATC Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met 370 375	
CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Vai 385 390	
TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTTCT Cys Leu 400	TT CAGGATGGGC CAACACTGAT 1376
GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGC	CAGTT GATTCCTTTC TCATCAGTTG 1436
GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCCAACACA CACAC	regeg Agtctgagtc Aggagagtga 1496
GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGG	TGTAC ACCTAGAAAG TCAAGCACCC 1556
TGAGAAAGAG GATATTTTTA TAACCTCAAA CATAG	GCCCT TTCCTTCCTC TCCTTATGGA 1616
TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTC	ATCCC TAGATGAAGG CCTCTTTTAT 1676
TTATTTTTT ATTCTTTTTT TCGGAGCTGG GGACC	GAACC CAGGGCCTTG CGCTTGCGAG 1736
GCAAGTGCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCC	CTGAA GGCCTCTTTC TTTCTGCCTC 1796
TGATAGTCTA TGACATTCTT TTTTCTACAA TTCGT	ATCAG GTGCACGAGC CTTATCCCAT 1856
TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATT	TTTCC CTCTGAAGAT TTGATTCGAG 1916
TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGGTAG GTTAT	GGTAG TTTATTTAAC AGACTGCCAC 1976
CAGGAGTCCA GTGTTTCTTG TTCCTCTGTA GTTGT	ACCTA AGCTGACTCC AAGTACATTT 2036
AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTC CTTCT	ATCAA CATTGGCTAG CTTTGTTTCA 2096
GGGCACTAAA AGAAACTACT ATATGGAGAA AGAAT	TGATA TTGCCCCCAA CGTTCAACAA 2156
CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCTGG TTCAG	TGTCT ACTGACTATG CGCCCTCTTA 2216
TTACTGCATG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAAT	AATAA TAATAGAAAT AAAATCTAGA 2276
CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAA	CTTAA GAAGCTTTGA GATTTCAGTT 2336
GTGTTAAAGG CTTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTT	CTGTA AAAGTTACTA ATATATCTGT 2396
AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCA	G 2432

配列番号: 1 2 1

配列の特徴

配列の長さ:401アミノ酸

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:121

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile 1 5 10 15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
20 25 30

Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr 35 40

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro 50 55 60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
65 70 75 80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu 85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr 100 105 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu 115 120 125

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg 130 135

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys 145 150 155

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Ile Gln Lys 165 170 175

- Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr 180 185 190
- Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg 195 200 205
- Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val 210 215 220
- Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile 225 230 235 240
- Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu 245 250 255
- Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln 260 265 270
- Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala 275 280 285
- Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly 290 295 300
- Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys 305 310 315
- Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn 325 330 335
- Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu 340 345 350
- Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr 355 360 365
- Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu 370 375 380
- Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys 385 390 395 400

Leu

配列の特徴

配列の長さ:1324塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

(ix)配列の特徴

配列を表す記号: CDS

存在位置: 90...1292

CCTTATATAA ACGTCA	ATGAT TGCCTGGGCT GC	CAGAGACGC ACCTAGCACT GACCCAGCGG 60
CIGCCTCCIG AGGITI		G AAC AAG TGG CTG TGC TGC GCA 113 t Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala 1 5
		A TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT 161 I Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu 20
		A GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG 209 D Glu Thr Gly His Gln Leu Leu 35 40
		C CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG 257 c Leu Lys Gln His Cys Thr Val 50 55
		C CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC 305 B Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp 70

AGC Ser	TGG Trp	CAC His 75	ACC Thr	AGT Ser	GAT Asp	GAG Glu	TGT Cys 80	GTG Val	TAT Tyr	TGC Cys	AGC Ser	CCA Pro 85	GTG Val	TGC Cys	AAG Lys	353
					AAG Lys											401
					GGG Gly 110											449
					CCG Pro											497
					TGC Cys											545
Glu	Thr	Ser 155	Ser	Lys	GCA Ala	Pro	Суз 160	Ile	Lys	His	Thr	Asn 165	Суз	Ser	Thr	593
					ATT											641
Cys 185	Ser	GLy	Asn	Arg	GAA Glu 190	Ala	Thr	Gln	Lys	Cys 195	Gly	Ile	Asp	Val	Thr 200	689
Leu	Cys	Glu	Glu	Ala 205	TTC Phe	Phe	Arg	Phe	Ala 210	Val	Pro	Thr	Lys	Ile 215	Ile	737
Pro	Asn	Trp	Leu 220	Ser	GTT Val	Leu	Val	Asp 225	Ser	Leu	Pro	Gly	Thr 230	ГЛа	Val	785
					GAG Glu											833
					CTG Leu											881
					ATC Ile 270											929
					GGC Gly											977

						AAG Lys 305					-	-		1025
					-	TCG Ser								1073
						GGT Gly						-	-	1121
-	_			 _		 AAA Lys								1169
					-	ATG Met								1217
		•		-		TTT Phe 385								1265
	C <b>AA</b> Gln			 		 TTA Leu	TAAG	CTAGO	GAA !	rggt(	CACTO	3G		1312
GÇT	TTTC	CTT C	CA											1324

配列番号: 1 2 3

配列の特徴

配列の長さ:401アミノ酸

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:123

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile 10 Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser 115 Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys 135 Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys 170 Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr 180 Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

200

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val 210 215 220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile 225 235 235

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu 245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln 260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser 275 280 285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly 290 295 300

Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys 305 310 315 320

Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu 340 345 350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr 355 360 365

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu 370 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys 385 390 395 400

Leu

配列番号:124

配列の特徴

配列の長さ:1355塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

(ix)配列の特徴:

配列を表す記号: С D S

存在位置: 94.1296

GTA	TATA	TAA	CGTG	ATGA	GC G	TACG	GGTG	C GG	AGAC	GCAC	CGG	agcg	CTC	GCCC.	AGCCGC	60
CGC	TCCA	AGC	CCCT	GAGG	TT T	CCGG	GGAC	C AC	Me				u Le		C TGC S Cys	114
GCG Ala	CTC Leu	GTG Val 10	TTT Phe	CTG Leu	GAC Asp	ATC Ile	TCC Ser 15	ATT Ile	AAG Lys	TGG Trp	ACC Thr	ACC Thr 20	CAG Gln	GAA Glu	ACG Thr	162
TTT Phe	CCT Pro 25	CCA Pro	AAG Lys	TAC Tyr	CTT Leu	CAT His 30	TAT Tyr	GAC Asp	GAA Glu	GAA Glu	ACC Thr 35	TCT Ser	CAT His	CAG Gln	CTG Leu	210
TTG Leu 40	TGT Cys	GAC Asp	AAA Lys	TGT Cys	CCT Pro 45	CCT Pro	GGT Gly	ACC Thr	TAC Tyr	CTA Leu 50	AAA Lys	CAA Gln	CAC His	TGT Cys	ACA Thr 55	258
GCA Ala	AAG Lys	TGG Trp	AAG Lys	ACC Thr 60	GTG Val	TGC Cys	GCC Ala	CCT Pro	TGC Cys 65	CCT Pro	GAC Asp	CAC His	TAC Tyr	TAC Tyr 70	ACA Thr	306
GAC Asp	AGC Ser	TGG Trp	CAC His 75	ACC Thr	AGT Ser	GAC Asp	GAG Glu	TGT Cys 80	CTA Leu	TAC Tyr	TGC Cys	AGC Ser	CCC Pro 85	GTG Val	TGC Cys	354
					GTC Val											402
GTG Val	TGC Cys 105	GAA Glu	TGC Cys	AAG Lys	GAA Glu	GGG Gly 110	CGC Arg	TAC Tyr	CTT Leu	GAG Glu	ATA Ile 115	GAG Glu	TTC Phe	TGC Cys	TTG Leu	450

	Ris					Pro	GGA Gly				val					498
					Val					Pro					TCA Ser	546
AAT Asn	GAG Glu	ACG	Ser 155	Ser	AAA Lys	GCA Ala	CCC	TGT Cys 160	AGA Arg	AAA Lys	CAC His	ACA Thr	AAT Asn 165	TGC Cys	AGT Ser	594
GTC Val	TTT Phe	GGT Gly 170	Leu	CTG Leu	CTA Leu	ACT Thr	CAG Gln 175	AAA Lys	GGA Gly	AAT Asn	GCA Ala	ACA Thr 180	CAC His	GAC Asp	AAC Asn	642
ATA Ile	TGT Cys 185	TCC Ser	GGA Gly	AAC Asn	AGT Ser	GAA Glu 190	TCA Ser	ACT Thr	CAA Gln	AAA Lys	ТСТ Суз 195	GGA Gly	ATA Ile	GAT Asp	GTT Val	690
ACC Thr 200	CTG Leu	TGT Cys	GAG Glu	GAG Glu	GCA Ala 205	TTC Phe	TTC Phe	AGG Arg	TTT Phe	GCT Ala 210	GTT Val	CCT Pro	ACA Thr	AAG Lys	TTT Phe 215	738
ACG Thr	CCT Pro	AAC Asn	TGG Trp	CTT Leu 220	AGT Ser	GTC Val	TTG Leu	GTA Val	GAC Asp 225	AAT Asn	TTG Leu	CCT Pro	GGC Gly	ACC Thr 230	AAA Lys	786
GTA Val	AAC Asn	GCA Ala	GAG Glu 235	AGT Ser	GTA Val	GAG Glu	AGG Arg	ATA Ile 240	AAA Lys	CGG Arg	CAA Gln	CAC His	AGC Ser 245	TCA Ser	CAA Gln	834
GAA Glu	CAG Gln	ACT Thr 250	TTC Phe	CAG Gln	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lys 255	TTA Leu	TGG Trp	AAA Lys	CAT His	CAA Gln 260	AAC Asn	AAA Lys	GCC Ala	882
CAA Gln	GAT Asp 265	ATA Ile	GTC Val	AAG Lys	AAG Lys	ATC Ile 270	ATC Ile	CAA Gln	GAT Asp	ATT Ile	GAC Asp 275	CTC Leu	TGT Cys	GAA Glu	AAC Asn	930
AGC Ser 280	GTG Val	CAG Gln	CGG Arg	CAC His	ATT Ile 285	GGA Gly	CAT His	GCT Ala	AAC Asn	CTC Leu 290	ACC Thr	TTC Phe	G <b>AG</b> Glu	CAG Gln	CTT Leu 295	978
CGT Arg	AGC Ser	TTG Leu	ATG Met	GAA Glu 300	AGC Ser	TTA Leu	CCG Pro	Gly	AAG Lys 305	AAA Lys	GTG Val	GGA Gly	GCA Ala	GAA Glu 310	GAC Asp	1026
ATT Ile	GAA Glu	AAA Lys	ACA Thr 315	ATA Ile	AAG Lys	GCA Ala	TGC Cys	AAA Lys 320	CCC Pro	AGT Ser	GAC Asp	CAG Gln	ATC Ile 325	CTG Leu	AAG Lys	1074
CTG ·	CTC Leu	AGT Ser 330	TTG Leu	TGG Trp	CGA Arg	ATA Ile	AAA Lys 335	AAT Asn	GGC Gly	GAC Asp	CAA Gln	GAC Asp 340	ACC Thr	TTG Leu	AAG Lys	1122

GGC CTA ATG CAC GCA Gly Leu Met His Ala 345	CTA AAG CAC TCA AAG Leu Lys His Ser Lys 350	G ACG TAC CAC TTT CCC AAA B Thr Tyr His Phe Pro Lys 355	1170							
Thr Val Thr Gln Ser	CTA AAG AAG ACC ATC Leu Lys Lys Thr Ile 365	AGG TTC CTT CAC AGC TTC Arg Phe Leu His Ser Phe 370	1218							
ACA ATG TAC AAA TTG Thr Met Tyr Lys Leu :	TAT CAG AAG TTA TTT Tyr Gln Lys Leu Phe 385	TTA GAA ATG ATA GGT AAC Leu Glu Met Ile Gly Asn 390	1266							
CAG GTC CAA TCA GTA A Gln Val Gln Ser Val 1 395	AAA ATA AGC TGC TTA Lys Ile Ser Cys Leu 400	TAACTGGAAA TGGCCATTGA	1316							
GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGATAA										

配列番号: 1 2 5

配列の特徴

配列の長さ:401アミノ酸

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:125

Met Asn Lys Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile 1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Glu Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp 20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr 35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro 50 55

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys 65 70 75

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu 85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
100 105 110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe 115 120 125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Fro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg 130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys 145 150 155

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys 165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr 180 185 190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg 195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val 210 215 220

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile 225 230 235 240

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu 245 250 255

Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln 260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala 275 280 285

Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly 290 295 300

Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Tie Glu Lys Thr Tie Lys Ala Cys Lys 305 310 315 Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn 325 330 335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser 340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr 355 360 365

Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu 370 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys 385 390 395 400

Leu

配列番号: 1 2 6

配列の特徴

配列の長さ:139アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:126

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys 1 5 10 15

Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro 20 25 30

48

Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala 35 40 45

Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys 50 55

Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr 65 70 75 80

Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn 85 90 95

Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His  $100 \hspace{1.5cm} 105 \hspace{1.5cm} 110$ 

Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly
115 120 125

Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys 130 135

配列番号:127

配列の特徴

配列の長さ:48塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:127

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA

配列番号: 1 2 8

配列の特徴

配列の長さ:219アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:128

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala 1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn 35 40 45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro 50 55

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro 65 70 75 80

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His 85 90 95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly 100 105 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg 115 120 125

Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp 130 135 140

Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly fle Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr 145 150 155 160

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp 165 170 175

Leu Cys Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg 180 185 190

Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly 195 200 205

Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr 210 215

配列番号:129

配列の特徴

配列の長さ:280アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:129

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp 65 70 75 80

Суз	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu
				85					90					95	

- Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
- Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg 115 120 125
- Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe 130 135 140
- Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu 145 150 155 160
- Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu 165 170 175
- Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr 180 185 190
- Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser 195 200 205
- Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu 210 215 220
- Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys 225 230 235 240
- Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu 245 250 255
- Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr 275 280

配列番号:130

配列の特徴

配列の長さ:207アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:130

Met Leu Arg Leu Ile Ala Leu Leu Val Cys Val Val Tyr Val Tyr Gly 1 5 10 15

Asp Asp Val Pro Tyr Ser Ser Asn Gln Gly Lys Cys Gly Gly His Asp 20 25 30

Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Cys Cys Ala Ser Cys His Pro Gly Phe Tyr  $35 \hspace{1cm} 40 \hspace{1cm} 45$ 

Ala Ser Arg Leu Cys Gly Pro Gly Ser Asn Thr Val Cys Ser Pro Cys 50 55

Glu Asp Gly Thr Phe Thr Ala Ser Thr Asn His Ala Pro Ala Cys Val 65 70 75 80

Ser Cys Arg Gly Pro Cys Thr Gly His Leu Ser Glu Ser Gln Pro Cys
85 90 95

Asp Arg Thr His Asp Arg Val Cys Asn Cys Ser Thr Gly Asn Tyr Cys 100 105

Leu Leu Lys Gly Gln Asn Gly Cys Arg Ile Cys Ala Pro Gln Thr Lys 115 120 125

Cys Pro Ala Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Arg Ala Gly Asp Thr 130 140

Leu Cys Glu Lys Cys Pro Pro His Thr Tyr Ser Asp Ser Leu Ser Pro 145 150 155

Thr Glu Arg Cys Gly Thr Ser Phe Asn Tyr Ile Ser Val Gly Phe Asn 165 170 175

Leu Tyr Pro Val Asn Glu Thr Ser Cys Thr Thr Thr Ala Gly His Asn 180 185 190

Glu Val Ile Lys Thr Lys Glu Phe Thr Val Thr Leu Asn Tyr Thr 195 200 205

配列番号: 1 3 1

配列の特徴

配列の長さ:227アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:131

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu I 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Glu 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg 100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu 115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg 130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val 145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr 165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly 180 185 190

Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser 195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser 210 215 220

Gln His Thr 225

配列番号:132

配列の特徴

配列の長さ:197アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:132

Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr 1 5 10 15

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu 20 25 30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr 35 40

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser 50 55 60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His 65 70 75 80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
85 90 95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr 100 105 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly 115 120 125

Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His 130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys 145 150 155 160

Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln 165 170 175

Lys Gly Thr Ser Gin Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met 180 185 190

Arg Ala Leu Leu Val 195

配列番号:133

配列の特徴

配列の長さ:208アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:133

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile 1 5 10 15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp 20 25 30

Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr 35 40

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro 50 55 60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys 70 75 80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu 85 90 95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr 100 105 110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu 115 120 125

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg 130 135 140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys 145 150 155 160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
165 170 175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr 180 185 190

Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg 195 200 205

配列番号:134

配列の特徴

配列の長さ:224アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:134

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn 35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala GIn Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys 50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr 65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser 85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly 100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys 115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr 130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His 145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln 165 170 175 Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro 180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr 195 200 205

Ala Pro Ser Thr Glu Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile 210 215 220

配列番号:135

配列の特徴

配列の長さ:205アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:135

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Phe Leu Leu Gly Leu 1 5 10 15

Ser Leu Gly Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro

Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val 35 40 45

Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro
50 60

Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr 65 70 75 80

Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro 85 90 95 Thr Glu Asp Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln 100 105 110

Asp Ser Ser His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly 115 120 125

His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys 130 135

Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp 145 150 155 160

Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr 165 170 175

Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp
180 185 190

Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val 195 200 205

配列番号: 136

配列の特徴

配列の長さ:191アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:136

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Val 1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln 20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro 35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys 50 55

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr 65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro 85 90 95

Gin Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr 100 \$105\$

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn 115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg 130 135

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro 145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu 165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu 180 185

#### 配列番号: 1 3 7

配列の特徴

配列の長さ:54塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:137

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC

配列番号: 1 3 8

配列の特徴

配列の長さ:380アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:138

Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His 20 25 30

Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser 35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro 50 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe 115 120 125

Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn 130 135

Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His 145 150 155 160

Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile 165 170 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr 180 185 190

Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly
195 200 205

Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser 210 215 220

Ser Gln Glu Gin Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn 225 230 235 240

Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys 245 250 255

Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu 260 265 270

Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro 275 280 285

Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu 290 295 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr 305 310 315 320

Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe 325 330 335

Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His 340 350

Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile 355 360 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu 370 375 380

配列番号:139

配列の特徴

配列の長さ:380アミノ酸

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:139

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His 1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His 20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr 35 40

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro 50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His 65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe 85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala 100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe 115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His 145 150 155

Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile 165 170 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr 180 185 190

Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly
195 200 205

Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser 210 215 220

Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn 225 230 235 240

Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys 245 250 255

Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu 260 265 270

Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala 275 280 285

Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile 290 295 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr 305 310 315

Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe 325 330 335

Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His 340 345 350

Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile 355

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu 370 375 380

配列番号:140

配列の特徴

配列の長さ:30塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:140

TGGACCACCC AGAAGTACCT TCATTATGAC

30

配列番号: 1 4 1

配列の特徴

配列の長さ:30塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:141

GTCATAATGA AGGTACTTCT GGGTGGTCCA

30

配列番号: 1 4 2

配列の特徴

配列の長さ:31塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:142

GGACCACCCA GCTTCATTAT GACGAAGAAA C

31

配列番号: 1 4 3

配列の特徴

配列の長さ:31塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:143

GTTTCTTCGT CATAATGAAG CTGGGTGGTC C

31

配列番号:144

配列の特徴

配列の長さ:29塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:144

GTGGACCACC CAGGACGAAG AAACCTCTC

29

配列番号: 1 4 5

配列の特徴

配列の長さ:29塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:145

GAGAGGTTTC TTCGTCCTGG GTGGTCCAC

29

配列番号:146

配列の特徴

配列の長さ:29塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:146

CGTTTCCTCC AAAGTTCCTT CATTATGAC

29

配列番号: 1 4 7

配列の特徴

配列の長さ:29塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:147

GTCATAATGA AGGAACTTTG GAGGAAACG

配列の特徴

配列の長さ:32塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:148

GGAAACGTTT CCTGCAAAGT ACCTTCATTA TG

32

配列番号: 1 4 9

配列の特徴

配列の長さ:32塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:149

CATAATGAAG GTACTTTGCA GGAAACGTTT CC

配列の特徴

配列の長さ:27塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:150

CACGCAAAAG TCGGGAATAG ATGTCAC

27

配列番号:151

配列の特徴

配列の長さ:27塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:151

GTGACATCTA TTCCCGACTT TTGCGTG

配列番号: 1 5 2

配列の特徴

配列の長さ:25塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:152

CACCCTGTCG GAAGAGGCCT TCTTC

25

配列番号:153

配列の特徴

配列の長さ:25塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:153

GAAGAAGGCC TCTTCCGACA GGGTG

25

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:154

TGACCTCTCG GAAAGCAGCG TGCA

24

配列番号: 1 5 5

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:155

TGCACGCTGC TTTCCGAGAG GTCA

24

配列の特徴

配列の長さ:24塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:156

CCTCGAAATC GAGCGAGCAG CTCC

24

配列番号: 157

配列の特徴

配列の長さ:25塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:157

CGATTTCGAG GTCTTTCTCG TTCTC

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:158

CCGTGAAAAT AAGCTCGTTA TAACTAGGAA TGG

33

配列番号:159

配列の特徴

配列の長さ:33塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:159

CCATTCCTAG TTATAACGAG CTTATTTCA CGG

33

配列番号: 1 6 0

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:160

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号: 1 6 1

配列の特徴

配列の長さ: 4 4 塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:161

CCTCTCTCGA GTCAGGTGAC ATCTATTCCA CACTTTTGCG TGGC

44

配列番号: 1 6 2

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: CDNA

配列の記載:配列番号:162

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号: 1 6 3

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:163

CCTCTCTCGA GTCAAGGAAC AGCAAACCTG AAGAAGGC

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:164

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号: 165

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:165

CCTCTCTCGA GTCACTCTGT GGTGAGGTTC GAGTGGCC

配列番号: 1 6 6

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の記載:配列番号:166

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号: 1 6 7

配列の特徴

配列の長さ:38塩基対

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: c D N A

配列の記載:配列番号:167

CCTCTCTCGA GTCAGGATGT TTTCAAGTGC TTGAGGGC

配列の特徴

配列の長さ:16アミノ酸

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列の記載:配列番号:168

Met Lys His His His His His His Ala Ser Val Asn Ala Leu Glu
1 5 10 15

【図1】

# FIG.1A

HAL PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCS PGQHAKVFCTKTSDTVCDSCED ALLVFLDIIEWTTQETFPPKYLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHCTVRRKTLCVPCPD STYTQLWNWVPECLSCGSRCSSDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPL 268 238 208 178 YSYTDSWHTS :: :: :: 148 FRI-1 FRI-1 ے لد ے لد SW:TNR2\_ SW:TNR2\_

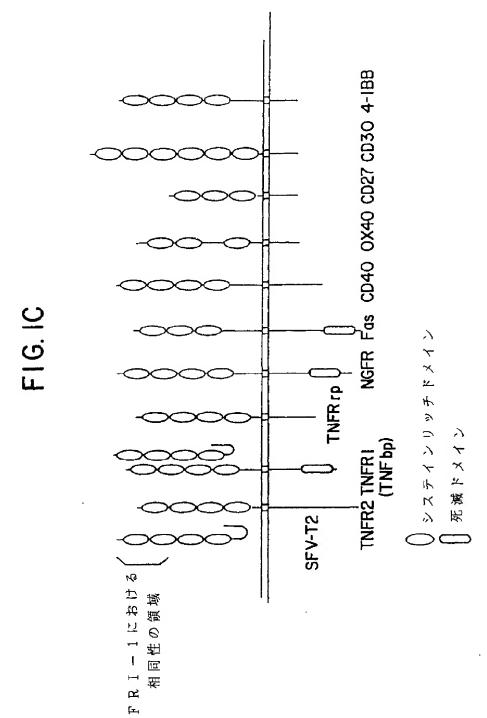
## FIG. 1B

6 YHYYDQNGRMCEECHMCQPGHFLVKHCKQPKRDTVCHKPCEPGVTYTDDW 69 YLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLKQHC.TVRRKTLCV.PCPDY.SYTDSW -: -: -: -TNFR 7 D 7 4 - 1)

FRI-1 116 H | | | TNFR 7 D 7 1 - 11 56 H

 $Z \times Z \times Z = 8.29$ 

【図1】



#### FIG.2A

**AUG** 

TAG

SP SP

FIG.2B

3.0 50 10 ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTGTTGCCCAGACCTTATATAAAACGTCATGTTCGCCTG 70 90 110 GGCAGCAGAGAAGCACCTAGCACTGGCCCAGCGGCTGCCGCCTGAGGTTTCCAGAGGACC 150 ACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGCACTCCTGGTGTTCTTGGACATCATTGAATGGACA LLVFLD 210 230 ACCCAGGAAACCTTTCCTCCAAAATACTTGCATTATGACCCAGAAACCGGACGTCAGCTC <u>O</u>ETFPPKYLHYDPETGRQL 250 270 290 TTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTAAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAG LCDKCAPGTYLKQHCTVRRK 310 330 350 T L C V P C P D Y S Y T D S W H T S D E 370 390 410 TGCGTGTACTGCAGCCCGTGTGCAAGGAACTGCAGACCGTGAAACAGGAGTGCAACCGC C V Y C S P V C K E L Q T V K Q E C M R 430 450 470 ACCCACAACCGAGTGTGCGAATGTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTCTGCTTG H N R V C E C E E G R Y L E L E F C L 490 510 530 AAGCACCGGAGCTGTCCCCCAGGCTTGGGTGTGCTGCAGGCTGGGACCCCAGAGCGAAAC K H R S C P P G L G V L Q A G T P E R N 570 550 590 ACGGTTTGCAAAAGATGTCCGGATGGGTTCTTCTCAGGTGAGACGTCATCGAAAGCACCC TVCKRCPDGFFSGETSSKAP 630 650 610 TGTAGGAAACACACCAACTGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCA CRKHT<u>N</u> CSSLGLLIQKG<u>N</u> A 710 690 670 ACACATGACÁATGTATGTTCCGGAAACAGAGAAGCAACTCAAAATTGTGGAATAGATGTC T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V 730 770 750 ACCCTGTGCGAAGAGGCATTCTTCAGGTTTGCTGTGCCTACCAAGATTATACCGAATTGG TLCEEAFFRFAVPTKIIPNW 790 810 830 CTGAGTGTTCTGGTGGACAGTTTGCCTGGGACCAAAGTGAATGCAGAGAGTGTAGAGAGG LSVLVDSLPGTKVNAES 870 890 850 ATAAAACGGAGACACAGCTCGCAAGAGCAAACTTTCCAGCTACTTAAGCTGTGGAAGCAT I K R R H S S Q E Q T F Q L L K L W K H 910 930 950 CAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATCATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC Q N R D Q E M V K K I I Q D I D L C E S 990 970 1010 AGTGTGCAACGGCATATCGGCCACGCGAACCTCACCACAGAGCAGCTCCGCATCTTGATG SVQRHIGHANLTTEQLRILM

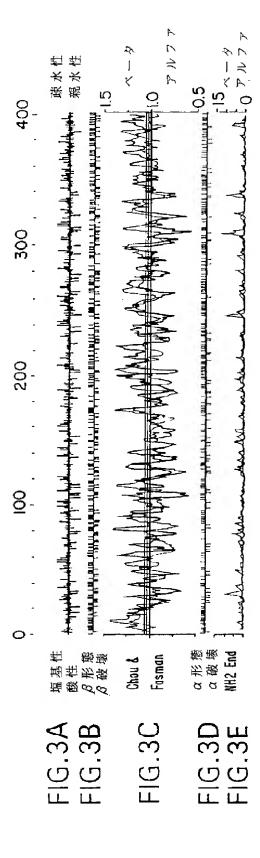
### FIG.2C

		1030						105	0					1	.070	1		
GAG	GAG	CTTGC	CTGG	GAA	GAA	GAT	CAC			CGA	GAT	TGA	GAG				CAC	CTCC
E	S	L P	G	K	К	I	S	P	D	E	ī	Ē	R	T	R	K	Tr	C
		1090						111	0			_		-	.130		•	•
AA	ACC(	CAGCG	AGCA	GCT	CCT	GAA	GC'l	ract	'GAG	CTT	GTG	GAG	GAT	CAA	AAA	TGC	AGA	CCAA
K	P	S E	Q	L	L	K	L	L	S	L	W	R	I	K	N	G	D	Q
		1150						117						1	1.90	)	_	
GAG	CAC	CTTGA.	AGGG	CCT	GAT	GTA	CGC	CACT	'CAA	GCA	CTT	GAA	AGC.	АТА	CCA	CTT	TCC	CAAA
D	${f T}$	L K		L	M	Y	Α	L	K	Н	L	К	A	Y	Н	F	P	ĸ
		1210						123						1	250	)	_	
ACC	CGT	CACCC.	ACAG	TCT	GAG	GAA	GAC	CAT	CAG	GTT	CTT	GCA	CAG	CTT	'CAC	CAT	'GTA	CCGA
$\mathbf{T}$	V	т н	S	L	R	K	$\mathbf{T}$	I	R	F	L	H	S	F	Т	М	Y	R
		1270						129						1	310	)		
TTC	GTA?	rcaga.	AACT	CTT	TCT.	AGA.	<b>LAA</b>	GAT	AGG	GAA	TCA	GGT"	TCA.	ATC	AGT	GAA	GAT	AAGC
$\mathbf{L}$	Y	Q K	L	F	L	Ε	М	I	G	N	Q	٧	Q	S	V	K	1	S
		1330						135			-				370			
TGO	CTT	YTAGT'	TAGG	AAT	GGT	CAC	TGG	GCT	GTT	TCT	TCA	GGA'	TGG	GCC	AAC	ACT	GAT	GGAG
C	L																	
		1390						141	0					1	430	}		
CAC	)TA	GCTG	CTTC	TCC	GGC'	гст	TGA	TAAL	GGC	AGT	TGA	TTC	CTT	TCT	CAT	CAG	TTG	GTGG
		1450						147							490			
GAZ	ATG!	AGAT	CCTC	CAG	CCC	AAC.	ACA			GGG	GAG	тст	GAG				TGA	GGCA
		1510						153							550	_		
GGC	TAT	TTGA	таат	TGT	GCA	AAG	СТС			GTA	CAC	CTA	AAS				כככי	DA OT
		1570						159							610			10110
AAA	GAC	GATA'	بالمنابية	ידאַידי	አልሮ	מייר ב	ΔΔΔ			רכר	THEFT.	ഗസ	יייטיי	יייטיייי ד		ירוי אירויי י	יא ממע	TC AC
		1630					. 14 11	165				CCI	100		670		GGA	IGNG
тас	יתר	AGAAG	بديدت	מיים	ימיים	ייניי	יים			ጥረረ	ന്നു.	ር አጥ/	ግ አ አ/	~~ <u>~</u>	O / O	· ·m·r	ירו א רווי	יים איים
		1690		U	C 111	101	101	171		100	CIA	GAI	Jun		730		INI	LIMI
התים	իփերկ	'ATTC	արագրագր	بالباليات	caa	አርር	TCC			አአር	CCA	<u> </u>	വസ				C 3 C (	CC 8 8
111		1750		* * *		AGC	100	177		MAC	CCM	GGG			790		GAG	CAA
CTC	CTC	TACC.	እርፕር	NGC	תמיד	አጥር።	m~~			ጥረግ አ	N.C.C	CCT					amai	TO A CT
GIC	3010	1810	nc I G	AGÇ	IAA	~1.C	100	183		IGA	AGG.	CC 10	CLI		850		CIC	IGAT
λCT	ג יוזי יים	ATGAC	አመጥር	תיתיתי	יידויוניי	מיים א	ר א א			ጥ/ጉ አ	a a	~~ ×	~~ n				~ ~ ~	
וטה	CIF	1870	HIIC	111	111,	~ 1 M		189		ICA	G(3 I)	GCA	CGA		910		CAT	1.16.1
A C C	ابطالات	CTAG	מראא	വസന	~ x ~/	יתיי	ת אינו		_	mmo	ccm	CMC	* * ^	_			0.00	mmcc
AGC	3111	1930	JCAA	GII	ONC	CGI	THO	195		TTC	CCT	CTG	AAG.				GAG	TTGC
NC 7	Cmu	rGGCT	እሮእር	אאר	~ > ~	200	m » ~			C C D D	amm	.071 % 0736	TIME &		970		0.0	0.00
HOF	4C 1 1	1990	MUNC	AAG	CAG	טטט	TAC	201		GTA	G.11.	TAT	FTA.				CAC	CAGG
አርባ	PCC 7	T990 AGTGT'	عادي الم	ידעריידוי	m	سب	א יוויי			com			k com		030		mmm	2001
AG I	LUCA	2050	rici	101	ICC	1 ( 1	طلعا	207		CCT	AAG	CTG	ACT		090		(T"T"T"	AGTA
arc r	\	2030 ' <mark>ለፕ</mark> ለል'	ጥሮ አ አ	~ A A	א ידיניי	א ידויים	יריידי			ም <u>ሶ</u> አ	N (7 N	TTTC:	~~~				יילולי א	acce
102	11.77.11	2110	ICNA	CAA	2111	1 11/3	110	213		ICN	AUA	110	ا باق		150		TUA	الالالا
A CT	ממח	AGAA.	ъста	ന്നു മ	ጥ አ ጥ	CC N	C A A			ረግ አጠ	N (TIFT)		000				CAN	CCCX
ac.	יאמי	2170	AC I A	CIA	TVI	GUM	GAF	219		GMI	ATT.	الرارا	<u> </u>		210		CAA	CCCA
ስጥረ	י כיייים	TATC	ראככ	an Can	רי א ידי		mere			C TIC	ጥአው	ጠረግ አ	c m x				emen a	mm x C
A.r.	101	2230	CAGC	131	CMI	<i>ع</i> دد	100	225		Gic	IAC	IGH	CIA		270		IIA	LIMC
TOO	י אידי מ	CAGT:	ል ል ጥጥ	ממיי	വസവം	ር አ አ	አጥአ			አጥአ	א ידי א	አሞአ	~ ^ ^				ימכ" מי	CTCC
100	`LJ T (	2290	uuri	CMA	C I G	GMA	M I F	231		.A. J. M	WIN	A LA	HHU		330		MUM	مدير
ATT	rga i	YTCTC'	тста	አልጥ	ATC	400	ΔጥΖ			מידייזי	ΔΩΛ	ACC	וליולטילו				ርሞው	СТСТ
		2350	~ - 1 - 0	1		JUM		237		TIM	11011	47 <b>.</b> 7	1		390			J131
ТАЛ	NAG(	GCTTT"	татт	'AAA	AAG	стс	ΑΤΌ			тст	AAA	AGT	<sub>ምልር</sub>				тдт	AAGA
		2410						243		I U I		- ( J L	ساده					
CTA	ATT	ACAGT.	ATTG	СТА	TTT	ATA	TCC			;								
•						•			424									

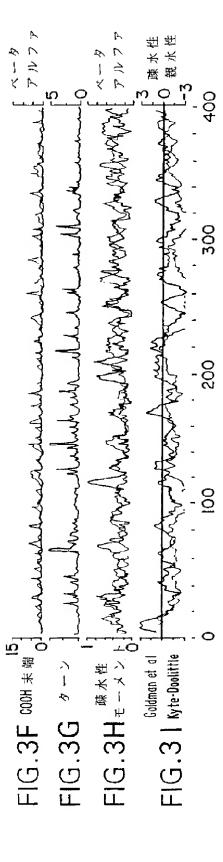
440m00m00 6450086486	997875759 9448759	Ц Н С) 4 00 00 00 00 00 00 Б) 4 4 00 00 10 00 4 00
	HAAOAOOHI WMHRRRVVI WMHRRRVVIII	1 [24   1   1   1   1   1   1   1   1   1
A L M L M C D C C C C C C C C C C C C C C C C C		
AGGERAGGE LEGNATA LOSHAPAIG FEGORAGI	中国COCOCOC         中国COCOCOCOC         中国COCOCOC         中国COCOCOC <t< td=""><td>  &gt; + +                                </td></t<>	> + +
		1 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
	T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
NO UN NEED BY STANKY ST		+ Q
H H H H H H H H H H H H H H H H H H H	<b>で図れららららららららららららららららららららららららららららららまままといとままとれまままままままままま</b>	H
>>   >	# # # # # # # # # # # # # # # # # # #	W
라타 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	OOOOIGIII EHAXIAIII OOOOIGIII	<u> </u>
	THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THEROORD THE THEROORD THE THEROORD THE THEROORD THE THE THE THE THE THE THE THE THE THE	+ 12 e d 編 D X X X X X X X X X X X X X X X X X X
**************************************	I SHKERGKE I EAEESKE I KKEKECEN I AEKOAKO I AEKOAKO I AEKOAKO	
ras.frg thirl.frg fv-t2.frg thfr2.frg cd40.frg osteo.frg ox40.frg	fas.frg thfrl.frg tv-t2.frg cd40.frg osteo.frg ox40.frg ox40.frg	fas.frg iv-t2.frg tnfr2.frg cd40.frg ssteo.frg ox40.frg ox40.frg
242	10 4% D	t is

152 101 1291 125 125 1128 105	2388 2386 2386 2574 2588	219 280 207 227 197 208 202 191
MERKETRE DI 4 VOUCOO	SOOFE STEE	T C H B C H H H H H H H H H H H H H H H H
	TTO SO 4 STT O SH T T T T T T T T T T T T T T T T T T	O P P O P P O P P P P P P P P P P P P P
000011860 000011800 000011860	SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCKITI SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC SACSOCC	
> H O X O M O M O M O M O M O M O M O M O M	東京王的王の日 日でででする日 日でででは、 日本の日	1
OHITH PERS	1 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	THEREARTOUP THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THEREARTH THER
A T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		44 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
	D P D D S S D N C N C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	2 X H N Z Z H N N H A N D D A N H H D D A H H D D A H H D D A H H D D D D
NO DE VACE A VAC	. Б.	まりなりまりませま まるりしひまられま 日間中中日口中日王
HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN HAMEN	O	OOIIIIII & GIIIII & KEIOIX E OHAHAHAH
HHOOKO4OK RNU4BBURK DOOOOOO		00111100 444111100 444111100
THONORHE NEWNAHIIM NEWNAHIIM NEWNAHIIM	<u>Новенео II</u> Поквато II епченеях II	0 0 0 mm 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
120010000 100000000 100000000 100000000	H	M C D   1   1   1   1   1   1   1   1   1
ANTITITE ANT	日	
00111111 12111111 5555555555555555555555	I I RAGAR LA I LAKHABI K I LAKHABI K I LAKHABI I LAKHABI	THITHITH THE THE COMMENCE THE THE COMMENCE THE COMMENCE T
fas.fr chil.fr sfv-t2.fr chft2.fr cd40.fr osteo.fr ngfr.fr ox40.fr	fas.fr thfrl.fr stv-t2.fr thfr2.fr cd40.fr osteo.fr ox40.fr 41bb.fr	fas.f. tnfrl.f. tnfr2.f. cdf0.f. osteo.f. ox40.f. 41bb.f.

【図3】



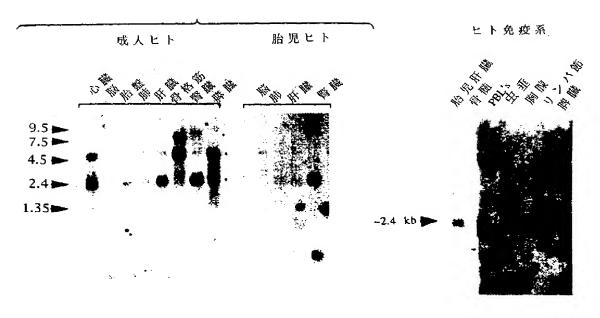
【図3】



【図4】

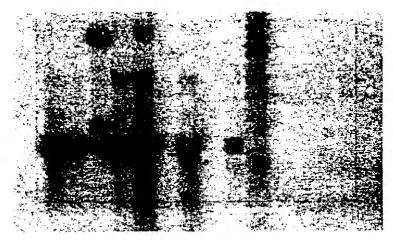
## FIG.4A

FIG.4B



【図5】

FIG.5



2 11 16 17 22 28 33 38 45 Kb 1 12 18 30トランスジェニック創始体対照

【図6】

FIG.6A

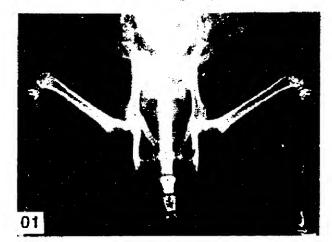


FIG.6B

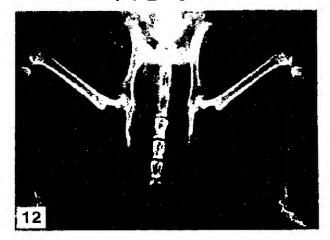
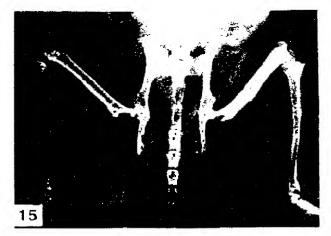


FIG.6C



【図6】

FIG.6D

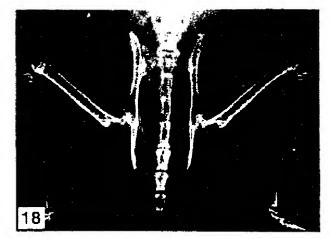


FIG.6E

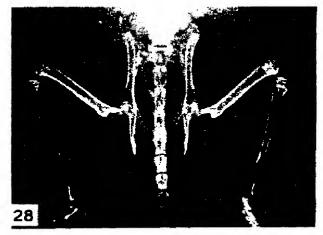
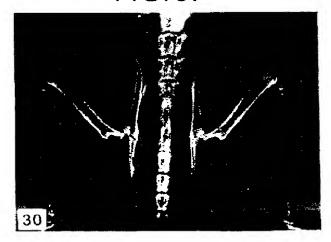


FIG.6F



【図6】

FIG.6G

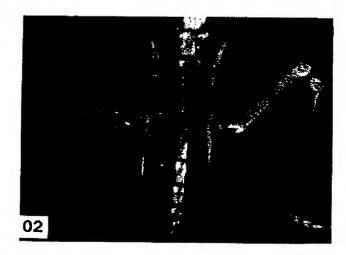
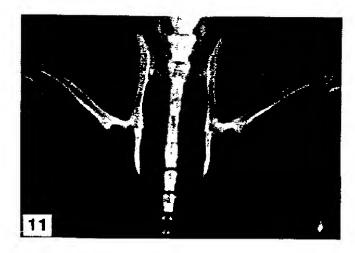


FIG.6H



【図6】

FIG.6I

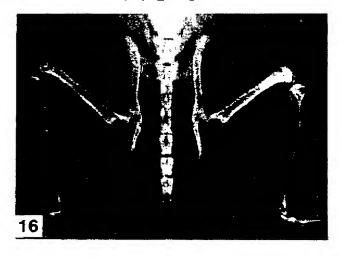
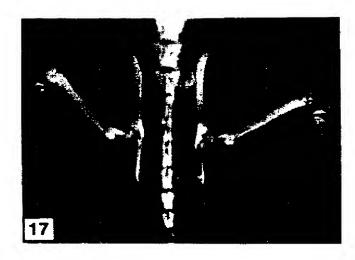
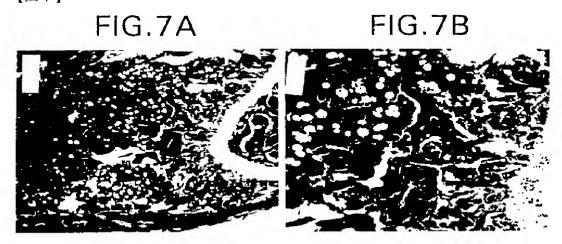
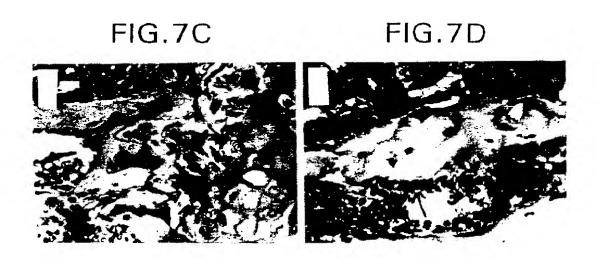


FIG.6J

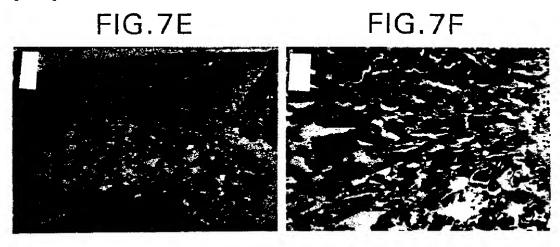


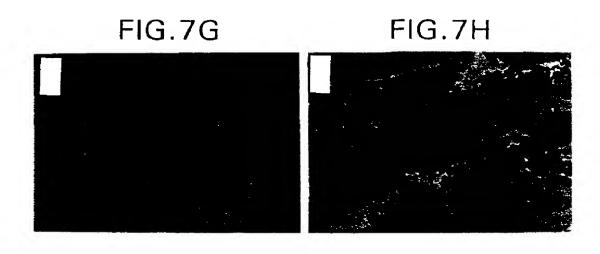
【図7】





【図7】





【図8】

FIG.8A FIG.8B

FIG.8C FIG.8D

# FIG.9A

		10	)					30	)						50			
CC	TTA'	TATA	ARAC	GTCA	TGA	TTG	CCT	'GGGC	TG	CAG	AGA	CGC	ACC	TAG	CAC	rga	CCC	AGCG
		70	)					90	)						110			
GC	TGC	CTCCT	rgag(	GTTT	CCC	GAG	GAC	CACA	AT	GAA	CAA	GTG	GCT	$\mathbf{G}\mathbf{T}\mathbf{G}$	CTG	CGC.	ACT	CCTG
										-	K		_		C	Α	L	
		130	)					150	)						170			
GT	GCT	CCTGC	λςν,	rcar	"ľGλ	λTG	GΛC	AACC	CA	GGA	λAC	CCT	TCC	TCC		GTA	CTT	GCAT
		L			Е					E	T	L,	P	Þ	K	Y	L	11
		1.90	)					210	)						230			
ΤА	TGA	CCCAC	AAA	CTGG	TCA	TCA	GCT	CCTC	TG	TGΛ	CΛΛ	ЛTG	TGC	TCC	TGG	CAC	CTA	CCTA
Y	D	P F	T	G	Н	0	L	L	C	D	K	С	Α	P	G	Т	Y	L
		250	)			~		270	)						290			
AA	ACA	GCACT	rgca	CAGT	'GAG	GAG	GAA	GACA	TT	<mark>'GTG</mark>	TGT	CCC	TTG	CCC	TGA	CCA	CTC	TTAT
ĸ	O	НО		v	R	R	K	т	L	Ĉ	v	P	Ĉ	P	D	Н	ŝ	Y
• •	*	310	)					330	)	_		-	_		350			
AC	GGA	CAĞÜ		ACAC	CAG	TGA	TGA		-	'nТА	TTG	CAG	CCC	AGT	GTG	CAA	GGA	ACTG
T	D	S V		т	S	D	E	C	v	Y	C	S	P	v	C	K	E	L
_	_	370	)		_	_		390	)	_	_				410			
CA	GTC	CGTG	AAGC	AGGA	GTG	CAA	CCG	CACC	CA	CAA	.CCG	AGT	GTG	TGA	GTG'	rga	GGA	AGGG
0	S	V I		E	C	N	R	T	Н	N	R	ν	C	E	C	E	E	G
π,	_	430			-			450	)						470			
CG	<b>ጥ</b> ግ Δ	CCTG	-	TCGA	ΑΤΤ	сто	ייים:		•	CCC	GAG	ста	TCC	CCC	GGG	CTC	CGG	CGTG
R	Y		3 I	E	F	Ĉ	L	K	Н	R	S	C	P	P	G	ŝ	G	v
	•	49(		1.7		•		510		10	-	_	•	-	530	~	~	•
OIII	C C A	AGCTO		cccc	****	ccc			•	THE PERSON NAMED IN	C 3 3		X TTY	TO C		TCC	بمست	C TOTAL C
																	F	F
V	Q	A (		P	E	R	N	T	V	С	K	K	С	Þ	D	G	F	r
		550	•					570	-						590			maaa
		TGAGA	-															
Ş	$\mathbf{G}$	_	r s	S	K	A	Р	C	I	K	H	Т	И	С	S	$\mathbf{T}$	F	G
		610						630							650			
CT	CCT	GCTA								TGA								
L	L	-	I Q	K	G	N	Α	${f T}$	Н	D	N	V	C	S	G	N	R	E
		67	-					690	_						710			
GC	CAC	GCAA		GTGC						GTC								
Α	T	-	K C	$\mathbf{G}$	I	Ð	V	$\mathbf{T}$	L	С	$\mathbf{E}$	E	A	F	F	$\mathbf{R}$	F	A
		73						750							770			
GI		TACC																
ν	Р	T	K I	Ι	P	N	W	L	S	v	L	V	D	S	L	P	G	${f T}$

### FIG.9B

810 830 AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAGAGCAAACC KVNAESVERIKRRHSSQEQT 850 870 890 TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC F Q L L K L W K H Q N R D Q E M V K K I 930 950 ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGCAGCGGCATCTCGGCCACTCGAACCTC I Q D I D L C E S S V Q R H L G H S N L 990 1010 T T E Q L L A L M E S L P G K K I S P E 1030 1050 1070 EIERTRKTCKSSEQLLKLLS 1090 1110 1130 TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG LWRIKNGDQDTLKGLMYALK 1150 1170 1190 CACT"FGAAAACATCCCACTT"FCCCAAAACTGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG H L K T S H F P K T V T H S L R K T M R 1210 1230 1250 TTCCTGCACAGCTTCACAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTCTTTTTAGAAATGATAGGG F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G 1290 1310 AATCAGGTTCAATCCGTGAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTT NQVQSVKISCL

CTTCA

# FIG.9C

		10	)						30							50			
GTA	TAT	ATA	ACG'	ГGA	TGA	GCG'	TAC	GGG	TGC	<b>GGA</b>	GAC	GCA	CCG	GAG	CGC	TCG	CCC.	AGC	CGC
		70							90							10			
CGY	CTC	CAAC	GCC	CCT	GAG	GTT	TCC	GGG	GAC	CAC	AAT	GAA	CAA	GTT	GCT	GTG	CTG	CGC	GCT
											M_	N	K.				C	_A_	
		130							150						_	70			
CGT	GTT								GAC										
ν_	_F_			I	_S_	I	_K_	_W_	_T_	T	_Q_	_E	T	F	Þ	P	K	Y	L
		190	)						210							30			_
TCA	TTA	TGA	CGA	AGA	AAC	CTC		TCA	GCT										
Н	Y	D	$\mathbf{E}$	E	${f T}$	S	Н	Q	L	L	C	D	K	C	P	P	G	T	Y
		250							270						_	90	•		
CCT	ΆλΑ	<b>VCV</b>		CTG					GAN										
L	ĸ	Q	H	C	T	Α	ĸ	W	K	Т	V	C	Α	₽	C_	P	D	Н	Y
		310							330						_	50			
		AGA			GCA				CGA						_		_		
Y	$\mathbf{T}$	D	S	W	Н	${f T}$	S	D	E	C	L	Y	C	S	P	V	C	K	E
		370							390						-	10			
GCT	GCA	GTA(		CAA	GCA	GGA			ATCG										
Ĺ	Q	Y	V	K	Q	E	C	И	R	$\mathbf{T}$	Н	N	R	V	C.	E	C	ĸ	Ε
		43							450						-	70			
									CTT										
G	R	Y	ŗ	E	I	E	F	С	L	K	H	R	S	С	P.	ţ.	G	F	G
		49				~~~		-	510	- ·					-	30		mac	·~ mm
AGT									SAAA				i⊂A.P K		ATC	p	AGA D	G	E.
V	V	Q_	^A	G	T	P	E	R	N 570	T	V	C	K	R	_	590	U	G	r
~~~		550		~		. mc	ma a	**	J , U	~m~	1111 N.C			CNO	-		CAC	an con	- CHIMIT
									CACC									V	F
F	S	Ŋ	E	T	S	S	K	A	P	С	R	ĸ	H	T	И	C	S	V	ŗ
		61							630							550			010
									ATGC										
G	L	L	L	T	Q	K	G	N	Α	$\mathbf{T}$	Н	D	N	I	C_	S	G	Ŋ	S
		67							690							710			
_		'AAC'	TCA	AAA					ATGT										
E	S	${f T}$	Q	K	C	G	1	D	V	Т	L	С	E	E	A	F	F	R	F
		73	0						750							770			
TGC	TGT	TCC'	TAC	AAA	GTI	TAC	CGCC	CTA	ACTG	GCI	PTAC	TG'	rcm	rGG7				'GCC	
Δ	V	p	Т	ĸ	F	T	Þ	И	W	T.	S	v	Ь	V	D	N	$\mathbf{L}$	Р	G

## FIG.9D

		79	0						810						8	30			
CAC	CAA	AGT	AAA	CGC.	AGA	GAG	TGT.	AGA	GAG	GAT	AAA	ACG	GCA	AÇA	CAG	CTC	ACA	AGA	ACA
${f T}$	K	v	N	Α	E	S	V	E	R	I	K		0	Н	S	S	0	E	0
		85	0				٠.		870				~		- 8	90	-	_	_
GAC'	TTI	CCA	GCT	GCT(	GAA	GTT.	ATG	GAA	ACA	rca	AAA	CAA.	AGA	CCA	AGA	ጥልጥ	AGT	CAA	GAA
$\mathbf{T}$	F	Q	L	L	K	L	W	K	H	Ó	N	K	D	0	D	I	v	ĸ	ĸ
		91	0						930	_			_	-	_	รถ	•	•	••
GAT	CAT	CCA	AGA'	TAT	TGA	CCT	CTG'	TGA	AAA	CAG	CGT	GCA	GCG	GCA			ACA	TGC	TAA
Ι	I.	O	D	I	D	L	C	E	N	S	v	0	Ŕ	H	I	G	Н	A	N
		97	0		_	_	•	_	990	_	•	V		•••	10	-	11	n	ы
CCT	CAC	-	_	GCA	GCT	rcg	TAG			4.05	ልልፎ	ىلىش	አሮር	ccc			አረጥ	ccc	አሮሮ
I.	т	F	E	0	L	R	S	T.	M	E	S	T.	P	GGG	K	GAA K	AG I		
_	_	103		×	-	11	U		050		J	ъ	P	G	10		V	G	A
AGA	404			מ א מ	አአሮ	ኢአጥ				788	X C C	~ > ~	ma 1	001			~	~~~	~~~
E	D	F	F	K	T	I	K K	эGС А						_		_			
ם	D	_		I	1	7	М		_	K	P	S	D	Q	I	L	K	L	L
CAC	1090 1110 1130 CAGTTTGTGGCGAATAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCAC																		
S	. I.	W	R	T	nna. K	AAAA													
3	Ü	115		T	r.	N	G	Đ,	*	D	$\cdot$ <b>T</b>	L	K	G	L	M	Н	A	L
2.2.20	~~ x	— —	_	73.0	ams.	201			170			~ - ~			11				
AAA0 K	GCA H	S S																	
K	п	$\frac{3}{121}$	K	T	Y	H	F	P.	K	$\mathbf{T}$	V	$\mathbf{T}$	Q	S	L	K	K	T	I
CAC	~mæ		-	23.00	~~~	~ . ~			230						12				
CAG																TTT			
R	F	L	`H ·	S	F	T	M	Y	K	L	Y	Q	K	L	F	L	E	M	Ι
		127	_						290						13				
AGG'	ľAA				ATC	AGT.	AAA	AAT	AAG	CTG	CTT.	ATA	ACT	GGA	AAT	GGC	CAT	TGA/	GCT
Ģ	N	Q	V	Q	S	Λ	K	I	S	С	L								
		133						_	350										
GTT	$\Gamma CC$	TCA	CAA'	PTG	GCG	<b>AGA</b>	TCC	CAT	$GG\Lambda^{\circ}$	I'GA	איד								

•	13.4	$\sim$	7
ľ	ועיו	u	
	$\sim$	,	

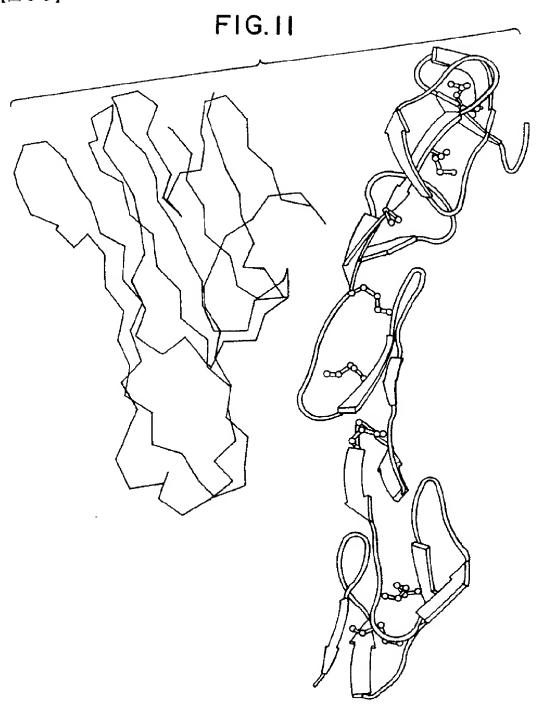
CALLY ELDITEWITQETEPPKYLHYDPETGROLLCOKCAPGTYL CALLY FLDITEWITQETFPPKYLHYDPETGROLLCOKCAPGTYL CALLY FLDITEWITQETFPPKYLHYDPETGROLLCOKCAPGTYL RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECVYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKQECNRT RRKTLCVPCPDHSYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYKGEDGFF CKEGRYLELEFCLKHRSCPPGIGVUQAGTPERNTVCKRCPDGFF CKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGIGVUQAGTPERNTVCKRCPDGFF CKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGIGVUQAGTPERNTVCKRCPDGFF KAPCIKHTNCSTFGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQKGGIDVT KAPCRKHTNCSTGLLLIQKGNATHDNVCSGNREATQKGGIDVT
muosteo.frg MNKWLCCA huosteo.frg MNKWLCCA huosteo.frg KQHCTVRR huosteo.frg KQHCTVRR huosteo.frg KQHCTVRR huosteo.frg HNRVCECE ratosteo.frg HNRVCECE huosteo.frg HNRVCECE

# FIG. 9

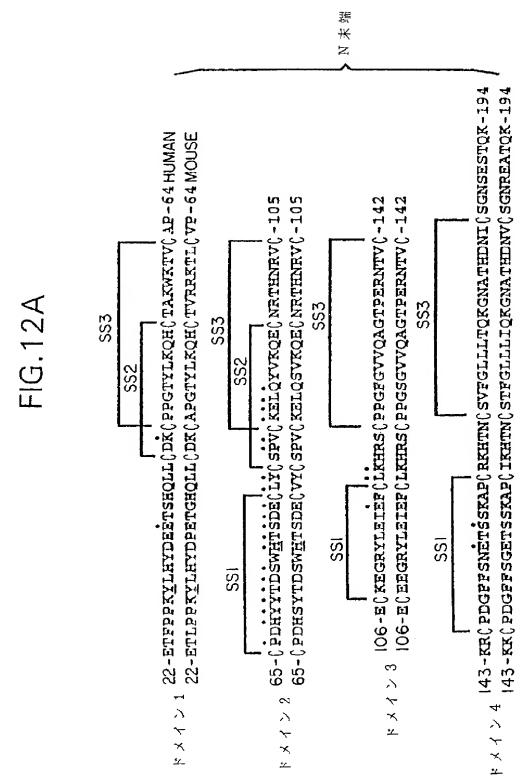
# FIG 1

4.9	998	139
9.9	93	139
1tary CPPQ - G KYI H P O N N S I CCTKCH KGTYL YN DCP G P G O DTDCR ECE S G SFTAS humoste PPKYL HYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKOHCTAK - W KTVCAPCPDHYYTDS	lenty ENHLRHCLSCS- KCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLF	linix QCFNCSLCLNG-TVHLSCQEKQNTVCT-CHAGFFLRENECVSC humoste - CLLKHRSCPPGFGVVQAGTPERNTVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKH

【図11】



【図12】



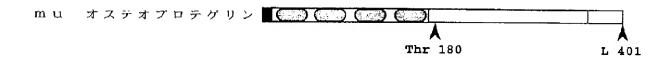
の末盤

# FIG. 12F

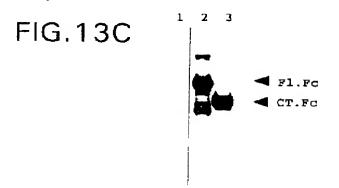
195-CGIDVTLÖBEAPFRFAVPTRFTPNWLSVLVDNLPGTRVNAESVERIKRQHSS-246	247-geqtfollklwkhonkdodivkkiiodidi <mark>c</mark> ensvorhighanltfeollksl-298	299-MESLPGKKVGAEDIEKTIKAÇKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALK-350	351-HSKTYHFPKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL-401
195-CGIDVTLOBEAPFRFAVPTRIIPNWLSVLVDSLPGTRVNAESVERIKRRHSS-246	247-geqtfollklwkhonrdqemvkkiiodidi <mark>c</mark> essvorhlghsnltteollal-298	299-MESLPGKKISPEEIBRTRKTÇKSSEQLLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMYALK-350	351-HLKTSHFPKTVTHSLRKTMRFLHSFTMYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL-401

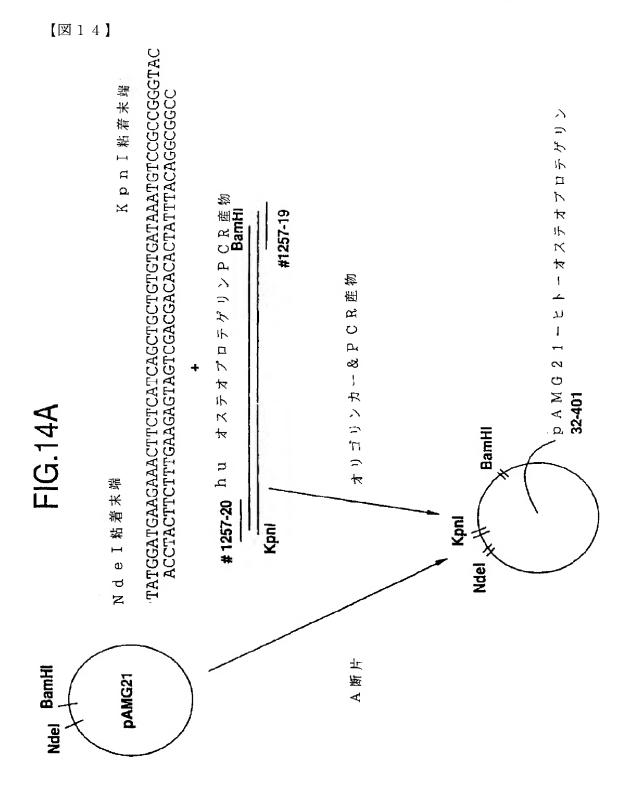
【図13】

FIG.13A









【図14】

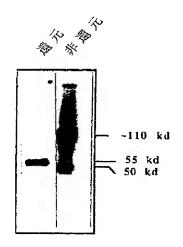
FIG.14B

リーン番号 1 2 3 4 5 6 7 8

97 kDa
69 kDa
46 kDa
30 kDa
22 kDa

【図15】

FIG.15



【図16】

### FIG.16A

細胞溶解物

培 地

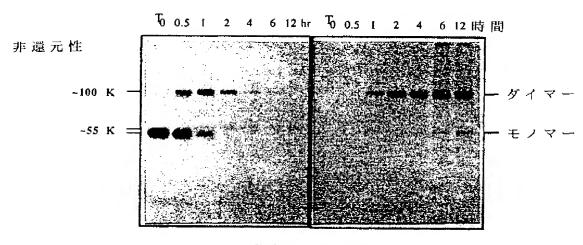
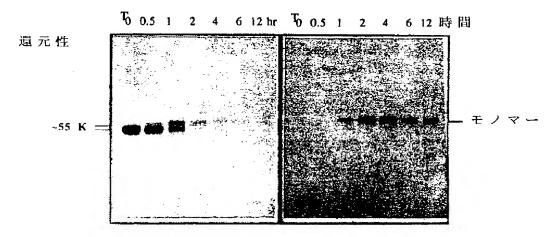
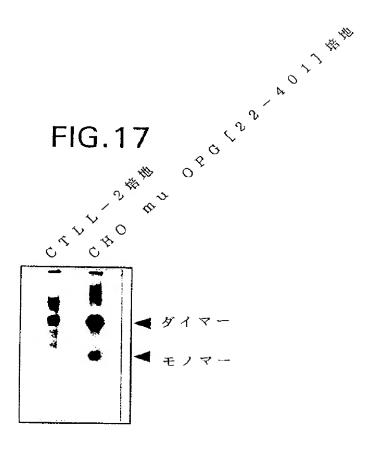


FIG.16B

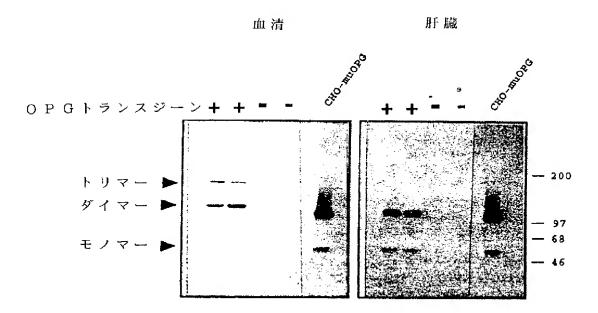


【図17】

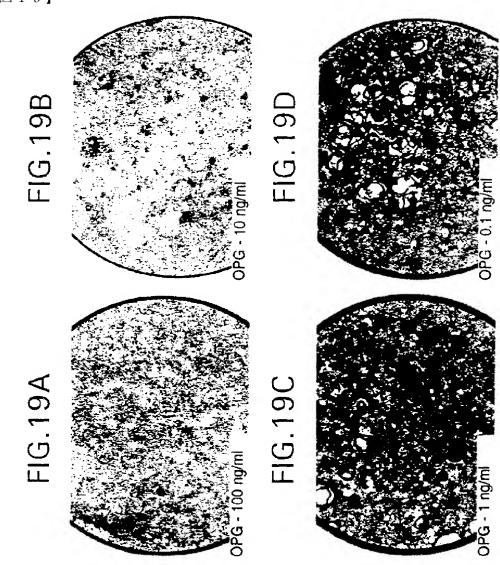


【図18】

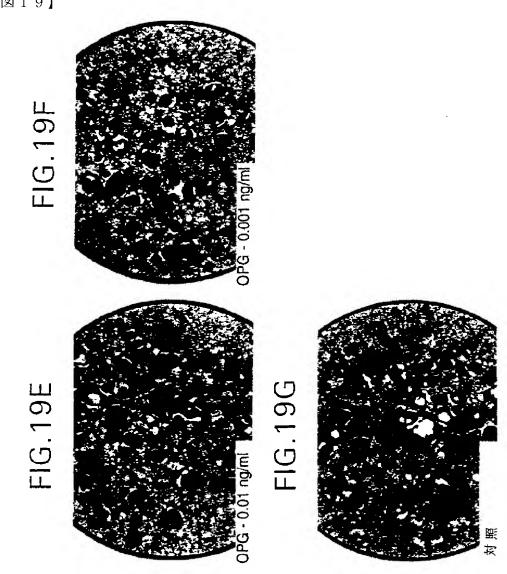
FIG.18



【図19】

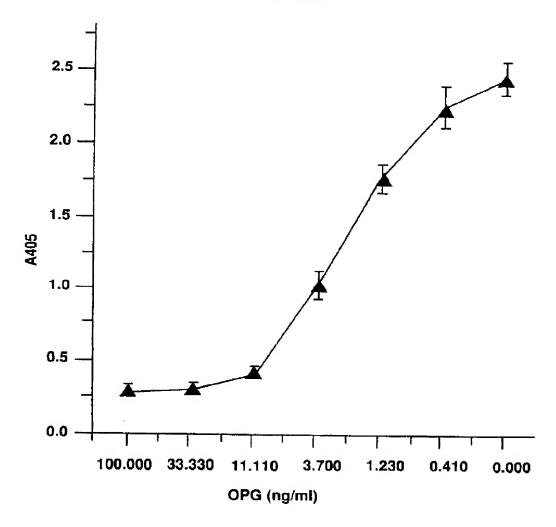


【図19】



【図20】

FIG.20



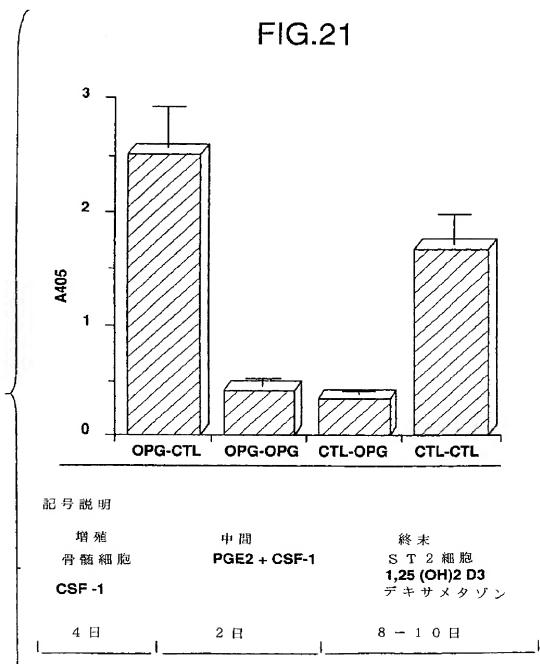


群

CTL - CTL OPG - CTL

OPG - OPG

OPG - OPG



**OPG** 

100 ng/mi

100 ng/ml

**OPG** 

100 ng/ml

100 ng/ml

【図22】

FIG.22A

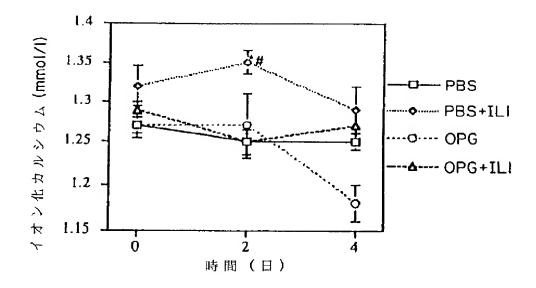
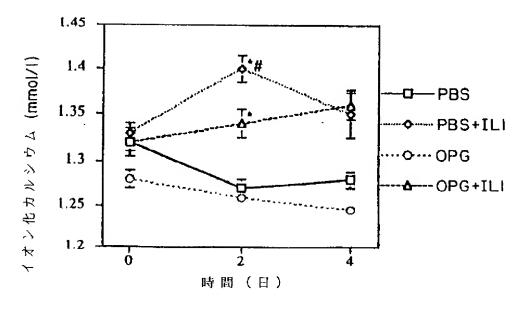


FIG.22B



\* P B S に対し異なる, p < 0.05 # O P G + I L 1 に対して異なる, p < 0.05 【図23】

# FIG.23A

### PBS/PBS



FIG.23B



【図23】

FIG.23C

### PBS/OPG

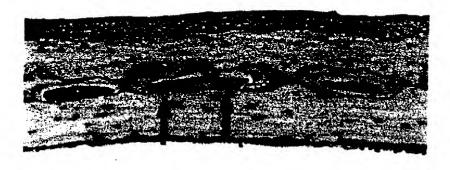
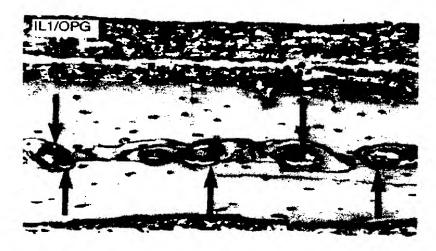
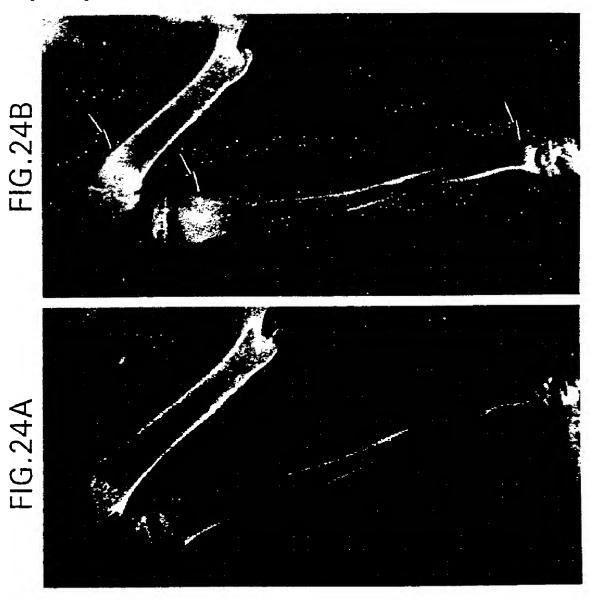


FIG.23D

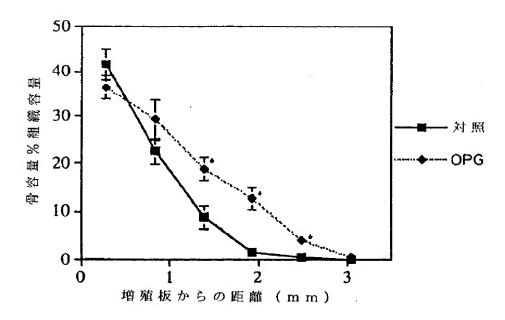


【図24】



【図25】

FIG.25



\* 対照に対して異なるp < 0.01

【図26】

FIG.26A

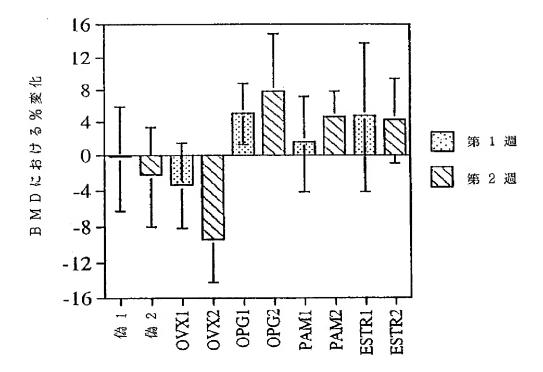






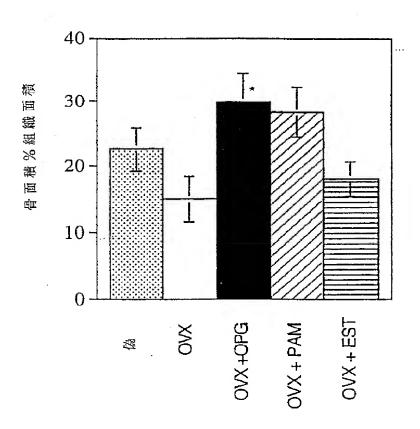
【図27】

FIG.27



【図28】

FIG.28



\*OVXに対して異なる p < 0.05

### 【国際調査報告】

	INTERNATIONAL SEAR		Interr nal App PC1/US 96	Application No 96/20621		
	FIGATION OF SUBJECT MATTER C12N15/12 C07K14/715 C12N5, C12N15/62 C07K16/28 C07K1, G01N33/566 A61K38/17 A61K48 to International Patent Classification (IPC) or to both mational cl	7107 C12Q1/ 8/00 C12N1/	68 GOIN	19/00 133/50 12N1/21,		
	S SEARCHED	assincation and tre.				
Minimum d IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by class: C12N C07K A01K C12Q G01N A6					
Documentat	tion searched other than minimum documentation to the extent t	hat such documents are in	cluded in the fields s	earched		
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data	hase and, where practical	, search terms used)			
C DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	ne relevant passages		Relevant to claim No.		
А	CELL, vol. 76, 25 March 1994, pages 959-962, XP002029050			1-60		
-	SMITH C.A. ET AL.: "The TNF re superfamily of cellular and vir proteins: activation, costimula death." cited in the application see the whole document					
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 88, 1991. pages 2830-2834, XP002029051 LEWIS M. ET AL.: "Cloning and of cDNAs for two distinct murin necrosis factor receptors demor receptor is species specific." see figure 1	1-60				
		-/				
X Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	_ <del>_</del>	members are listed	in annex.		
"A" docum conside "E" cartier of filing o		cited to understar invention "X" document of part cannot be conside	th the application but eory underlying the claimed invention be considered to			
which citation "O" docume other r "P" docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filing dats but han the priority date claimed	cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventure step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obviour to a persen skilled in the art.  "&" document member of the same patent family				
	actual completion of the international search	the international se				
9	April 1997	16. 04. 97				
Name and n	radiing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  NL - 2280 HV Rijewijk Td. (+ 31-70) 340-2640, Tx. 31 651 cpc nl, Fax (+ 31-70) 540-3016	Awthorized officer				

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

	INTERNATIONAL SEARC	CH REPORT	Inte onel Appl	ication No					
A. CLASS IPC 6	IFICATION OF SUBJECT MATTER C12R1:19)								
According t	to International Patent Classification (IPC) or to both national class	sification and IPC							
B. FIELDS	SEARCHED								
Minimum d	ocumentation searched (classification system followed by classification)	ation symbols)							
Documental	tion searched other than minimum documentation to the extent that	t such documents are inc	ejuded in the fields s	earched					
Electronic d	Electronic data base consulted during the international search (name of data hase and, where practical, search terms used)								
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT								
Category "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages		Relevant to claim No.					
A	SCIENCE, vol. 252, 1991, pages 1651-1656, XP000645049 ADAMS M.D.: "Complementary DNA sequencing:expressed sequence ta human genome project." cited in the application see the whole document		1-60						
A	US 5 447 851 A (BEUTLER BRUCE A September 1995 see the whole document		36-38,57						
A		28,29							
	her documents are listed in the continuation of box C,	Patent family	members are listed :	n annex.					
"A" docum conad "E" earlier filing of "L" docum which citation "O" docum other of "P" docum later the	ant which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another n or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	or priority date a cired to understar invention  "X" document of participation to coindid involve an invent  "Y" document of participation of coindid document is commented to coindid document is commented, such commented in the art.  "&" document membe	X' document of particular relevance; the damed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone of the considered to involve an invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such document, such combination being obvious to a person stilled						
Name and r	mailing address of the ISA  European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,  Fac (+31-70) 340-3016	Authorized officer							

Form PCT/ISA/218 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

rnational application No.

PCT/US 96/20621

Box I	Observations where certain claims were found unscarchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This Inte	ernational Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X	Claims Nos.: 43-45,49-53 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of (diagnostic method practised on) the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the com- pound/composition.
2.	Claims Nos.; because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.; because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the record and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Ince	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international Search Report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searches without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
	As only some of the required additional scarch fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT Inter and Application No

	information on patent family men	nbers	96/20621	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	,	Publication date
US 5447851 A	05-09-95	NONE		
US 4179337 A	18-12-79	CA 103367: CH 616942 DE 243388: FR 2313939 GB 1469472 JP 1152589 JP 50042087 JP 56023587 NL 7409776 SE 441753 SE 7409366	2 A 3 A 2 A 2 C 7 B 3 B	27-06-78 30-04-80 05-02-76 07-01-77 06-04-77 30-06-83 16-04-75 01-06-81 22-01-75 04-11-85 21-01-75
				÷

Form PCT/ISA/310 (patent family annex) (July 1992)

\_\_\_\_\_

### フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>		識別記	記号			FΙ		
C 0 7 K	14/715	11102/7 71	,			C 0 7 K	16/28	
COIR						COIR		
	16/28						19/00	
	19/00					C12N	1/21	
C 1 2 N	1/21					C 1 2 P	21/02	С
	5/10					C 1 2 Q	1/68	Α
C12P	21/02					G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/68						33/53	D
G 0 1 N	33/15					C 1 2 P	21/08	
	33/53					C 1 2 N	5/00	В
// C12P	21/08					A 6 1 K	37/02	ADT
(C 1 2 N	1/21							
C 1 2 R	1:19)							
(C 1 2 P	21/02							
C 1 2 R	1:91)							
(C 1 2 P	21/02							
C 1 2 R	1:19)							
(81)指定国		ΕΡ(ΑΤ,	BE, CI	Н,	DΕ,			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 カルゾーン,フランク・ジエイ アメリカ合衆国、カリフオルニア、ウエス トレイク・ビレツジ、リム・クレスト・サ ークル・841

(72)発明者 チヤン, ミンーシ アメリカ合衆国、カリフオルニア、ニユー バリー・バーク、カレ・ラス・コリナス・ 736